



Recombinaison Génétique à l'Échelle de la Molécule Unique : Micromécanique des Jonctions de Holliday et Activité du Complexe RuvAB

Alexandre Dawid

► To cite this version:

Alexandre Dawid. Recombinaison Génétique à l'Échelle de la Molécule Unique : Micromécanique des Jonctions de Holliday et Activité du Complexe RuvAB. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. Français. NNT : . tel-00012063

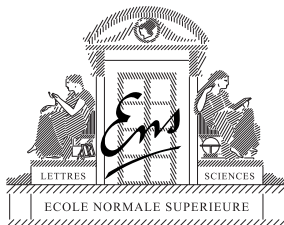
HAL Id: tel-00012063

<https://theses.hal.science/tel-00012063>

Submitted on 30 Mar 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE - DÉPARTEMENT DE PHYSIQUE

LABORATOIRE PIERRE AIGRAIN

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI

spécialité : biophysique moléculaire

présentée par :

ALEXANDRE DAWID

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI

**Recombinaison Génétique à l'Échelle de la Molécule Unique :
Micromécanique des Jonctions de Holliday
et Activité du Complexe RuvAB**

***Genetic Recombination at the single molecule level :
Holliday Junction Micromechanics
and RuvAB complex Activity***

soutenue le 23 septembre 2005 devant le jury composé de :

Mme	Bénédicte	MICHEL	Rapporteur
M	Didier	CHATENAY	Rapporteur
M	Jean-François	JOANNY	Examineur
M	Jean-Louis	SIKORAV	Examineur
M	Jean-Louis	VIOVY	Examineur
M	François	HESLOT	Directeur de thèse

Remerciements

C'est un plaisir de pouvoir évoquer ici toutes celles et ceux qui ont contribué, suivi ou accompagné, de près ou de loin, cette thèse.

Celle-ci s'est déroulée au Laboratoire Pierre Aigrain (UMR 8551 de l'ENS, du CNRS et des Universités Paris 6 et Paris 7), dirigé par le professeur Claude Delalande, à qui j'exprime mes plus vifs remerciements pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir accordé son soutien dans mon travail de recherche.

Je remercie les membres du jury de thèse qui m'ont fait l'honneur de porter leur regard critique sur ce travail : Bénédicte Michel, auprès de qui je m'excuse de n'avoir finalement pas pu développé les problématiques biologiques aussi loin que je l'aurais souhaité, Didier Chatenay qui a accepté en toute urgence d'être rapporteur, Jean-Louis Sikorav que je remercie pour l'attention particulière qu'il a accordé à mon manuscrit et pour ses précieuses suggestions, ainsi que Jean-Louis Viovy et Jean-François Joanny, que j'ai désormais tous deux le plaisir de côtoyer à l'Institut Curie.

J'adresse ici ma plus profonde gratitude à mon directeur de thèse, François Heslot, pour m'avoir accordé sa confiance en m'acceptant dans son équipe, et pour m'avoir guidé et soutenu tout au long de cette thèse. François, j'ai eu énormément de plaisir et de satisfaction à travailler à tes côtés durant ces quelques années, et j'ai avant tout pu apprécier la richesse scientifique et la très grande qualité de ton encadrement. Mais je retiendrai également tes talents de fin pédagogue, tes remarquables qualités d'expérimentateur (mêlées à du génie pour la bidouille et le bricolage!), et ton étonnante capacité à imaginer une solution à chaque problème. De plus, tout au long de cette thèse, tu as réussi le tour de force d'être à la fois extrêmement présent et disponible tout en me laissant une entière liberté dans la conduite de mon travail. Je resterai également marqué par ta patience à toute épreuve et ton immense gentillesse. J'ai aussi découvert un directeur de thèse d'une extrême générosité, qui s'investit sans compter pour les membres de son équipe, et à qui il tient à cœur que leur travail aboutisse avec succès. Enfin et surtout, j'ai particulièrement apprécié l'esprit de rigueur, de qualité et d'honnêteté scientifique que tu as insufflé en permanence dans ce travail. Ton enthousiasme, ton exigence et ta foisonnante imagination auront été des moteurs tout au long de ces années enrichissantes.

Je remercie tous les membres de l'équipe "Physique du Vivant" avec qui j'ai eu le grand plaisir de pouvoir travailler. Tout d'abord Philippe Thomen, en thèse au moment de mon arrivée dans l'équipe (et maintenant maître de conférence aux côtés de François) et qui m'a aidé, dès mon arrivée, à me familiariser avec le matériel et les méthodes utilisées au laboratoire. Merci à Fabien Guillemot pour avoir contribué de façon décisive aux expériences sur la mesure du pas de l'ADN, et pour avoir été d'une aide précieuse tout au long de la rédaction du présent manuscrit, à la fois pour sa connaissance de LaTeX mais aussi pour sa relecture intransigeante. Je le remercie également pour avoir amené avec lui sa bonne humeur et son franc parler qui auront malicieusement animé ces années de thèse. Enfin, je salue Camille Brème pour sa gentillesse et son calme remarquables ; je suis sûr qu'elle saura prendre la relève avec succès. Je vous souhaite à tous deux bonne chance pour la suite.

Je remercie également Vincent Croquette, du Laboratoire de Physique Statistique, avec qui j'ai eu la chance et le plaisir de pouvoir collaborer. Vincent, ton assistance pour le montage, le réglage et l'utilisation de la pince magnétique aura été on ne peut plus précieuse. Je te remercie également pour ta disponibilité et pour la patience dont tu as fait preuve pour m'expliquer en détail toutes les subtilités entourant l'analyse des images et la calibration de l'instrument. Enfin, ton regard éclairé sur les expériences de micromanipulation de l'ADN et ton expérience des phénomènes qui y sont mis en jeu auront influencé de façon importante la manière avec laquelle j'ai finalement abordé ces travaux.

Par ailleurs j'ai eu la chance, au commencement de ma thèse, d'être accueilli pendant plusieurs semaines dans l'équipe de David Bensimon, Vincent Croquette et Jean-François Allemand, ce qui m'a permis de commencer immédiatement à me familiariser avec la technique des pinces magnétiques. Je les en remercie donc, ainsi que tous les membres de leur équipe qui m'ont apporté assistance, en particulier Pierre Neveu et Giuseppe Lia.

Une partie de ce travail a été faite en collaboration avec Mikhaïl Grigoriev, du Laboratoire de Biologie Moléculaire des Eucaryotes, à Toulouse, que je remercie.

Je remercie également Christophe Voisin, du LPA, pour son assistance lors des mesures de calibrations par Fabry-Perot faites sur le site de Montrouge.

Enfin, je salue ceux que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces années à l'ENS : Denis Côte, Ulrich Bockelmann, Pascal Lopez, Paul Levinson (merci encore pour tes madeïnes et tes inoubliables flans au caramel!).

Je souhaite également remercier ici Anne Matignon, secrétaire du laboratoire, qui fait sans doute l'unanimité au LPA pour sa compétence et son rôle inestimable pour faciliter les tâches administratives et alléger le travail de chacun. Anne, ce fut un réel plaisir de t'avoir comme secrétaire, merci pour ton professionnalisme et ton aide sans faille, merci pour ta gentillesse et garde aussi longtemps que possible ta constante bonne humeur!

Sans oublier les ingénieurs, techniciens et autres personnels du LPA et du département de Physique : en particulier David Darson, Philippe Pace, Noël Le Rolland, Laurent Réa et Pascal Morfin qui m'ont apporté leur précieux concours pour la construction du montage, Jean-François Point, Didier Courtiade et Madame Guérard pour leur dynamisme et leur gentillesse.

Ces quelques années d'effort sont inévitablement associées au souvenir des meilleurs moments passés, à Paris ou ailleurs, avec ceux, camarades ou amis, que j'ai eu la chance de pouvoir avoir à mes côtés : Géraldine, Leila et tout le "G-club"; Pascal, Katia, Greg, Hélène, Nath, Nico, Yann, Caro; Oliv', Paul, Sylvain et la bande des basketteurs en folie; les globe trotteuses : Albane et Sylvie; François, Damien, Seb, et toute la bande!... Je remercie également Barbara pour sa gentillesse, sa tendre complicité et tous les excellents moments que j'ai pu passer avec elle, et j'espère que nous aurons pendant longtemps encore nos interminables mais néanmoins passionnantes discussions. Je tiens également à remercier Pierre et Monique Borgeaud, tout d'abord pour les excellentes conditions dans lesquelles s'est déroulé mon séjour au centre de Saclay, mais aussi et surtout pour leur générosité et les merveilleux moments passés en leur compagnie. D'autre part, j'ai été profondément touché par tous ceux qui m'ont témoigné de leur générosité, de leur soutien et de leur affection pendant ces années : Abbas Sharif, Denise Renault, Michel et Mireille Philippin, merci pour tout. Enfin, toute ma sympathie à Sylvette et à la belle famille.

Par ailleurs, je n'aurais jamais pu mener à bien cette thèse sans les encouragements et le soutien indéfectible d'Ariane Sharif. Son enthousiasme, sa curiosité, son esprit critique, son intégrité et sa culture scientifique m'auront servi de guide tout au long de ce travail. Ariane, sache que ton influence aura été beaucoup plus importante que tu ne l'imagines et que tes qualités, qui te promettent à n'en pas douter à une carrière brillante, resteront pour moi une référence. Pour tout ce que tu m'as apporté, et bien plus encore, merci.

Enfin, je suis infiniment reconnaissant à Gaëlle Philippin pour sa patience, son soutien, sa générosité et son dévouement au cours de ces derniers mois. Non seulement tu m'as supporté pendant une des phases les plus difficiles de la thèse, faisant le maximum pour me libérer de toutes contraintes matérielles, mais tu as également accepté de sacrifier des week-ends entiers à la relecture du présent manuscrit. J'ai eu une chance fabuleuse de t'avoir à mes côtés. Sache à quel point tu as contribué à mon équilibre tout au long de cette période décisive, et reçois ici toute mon affection.

Pour finir, je remercie du fond du fond du cœur mon père et ma mère, mes grands parents, ainsi que mes oncles, tantes, cousins et cousines qui m'ont constamment entouré de leur affection et m'ont toujours soutenu et encouragé tout au long de mon parcours. A vous tous, merci infiniment pour votre soutien inestimable et sans faille.

Table des matières

Introduction	11
I Les jonctions de Holliday et le complexe RuvABC	13
1 Les jonctions de Holliday	15
1.1 L'ADN [1]	15
1.1.1 Structure de l'ADN	15
1.1.2 Le code génétique	16
1.1.3 Autres conformations possibles pour l'ADN	17
1.2 Le modèle initial de Robin Holliday	19
1.2.1 Le problème de la conversion de gène	19
1.2.2 Une solution élégante	19
1.3 Les jonctions de Holliday et la recombinaison homologue	22
1.3.1 Preuves de l'existence des jonctions de Holliday	22
1.3.2 Rôle général des jonctions de Holliday	22
1.3.3 Importance de la recombinaison homologue	23
1.4 Structure des jonctions de Holliday	24
1.4.1 La diversité des conformations accessibles	24
1.4.2 Structure et dynamique des jonctions de Holliday	25
1.5 Migration du point de branchement	28
1.5.1 La migration spontanée	28
1.5.2 Deux conventions pour la définition de la vitesse de migration	28
1.6 Cinétique des changements de conformation et de la migration spontanée	30
1.6.1 Mesure du temps caractéristique de la migration - effet du magnésium	30
1.6.2 Effet des hétérologies de séquence - le pas de la migration (1)	31
1.6.3 Paysage énergétique - le pas de la migration (2)	31
2 Le Complexe RuvABC	35
2.1 Le locus <i>ruv</i>	36
2.1.1 Identification des 3 gènes <i>ruvA</i> , <i>ruvB</i> et <i>ruvC</i>	36
2.1.2 Régulation de l'expression des gènes <i>ruv</i>	36
2.1.3 Rôles biologiques connus pour les gènes <i>ruv</i>	37
2.2 RuvA	37

2.2.1	Description de RuvA	37
2.2.2	Action sur les jonctions de Holliday	37
2.3	RuvB	38
2.3.1	Description de RuvB	38
2.3.2	RuvB est une protéine de la famille AAA+	38
2.4	RuvAB	39
2.4.1	Action <i>via</i> RuvA sur les jonctions de Holliday	39
2.4.2	Migration des jonctions de Holliday : rôle moteur de RuvB et rôle structurel de RuvA	40
2.4.3	Structure du complexe RuvAB	40
2.4.4	Rôle actif de RuvA	40
2.4.5	Activité migratoire de RuvAB	42
2.5	RuvC	43
2.5.1	Description de RuvC et action sur les jonctions de Holliday	43
2.5.2	Coordination avec RuvAB	43
2.6	Fonctionnement du moteur RuvAB(C)	45
2.6.1	Structure et interaction des sous-unités RuvA et RuvB	45
2.6.2	Activité ATPase et effet des mutations	45
2.7	Questions en suspens	47
2.7.1	Quel modèle de cycle catalytique?	47
2.7.2	Un complexe RuvABC?	48
2.7.3	Relation entre l'hydrolyse et la migration	49
2.7.4	Action coordonnée des sous-unités du complexe	49
2.7.5	Le pas de la migration	50
2.7.6	Dynamique de la migration	50
II	Montage expérimental	51
3	La Pince Magnétique	53
3.1	Principe de fonctionnement d'une pince magnétique	53
3.2	Description du montage	53
3.2.1	Architecture du montage	53
3.2.2	Les différents éléments de l'appareil	54
3.3	Mesure du mouvement des billes	59
3.3.1	La méthode de mesure : l'analyse d'image	59
3.3.2	Mesure de la position d'une bille en deux dimensions	60
3.3.3	Mesure de la position verticale d'une bille	61
3.3.4	Précision de la mesure et dérives mécaniques	62
3.4	Calibration de l'instrument : la mesure de force	62
III	Micromanipulation de la jonction de Holliday	69
4	Le pas de l'ADN en solution (article soumis)	71

5	Etudes en présence d'ions magnésium	79
5.1	Formation de la jonction en magnésium	79
5.1.1	Résultats préliminaires	79
5.1.2	Méthode employée pour la formation de la jonction en magnésium .	83
5.2	Caractère cinétique de la migration en magnésium	85
5.3	Cinétique de la migration sous contraintes mécaniques	90
5.3.1	Quelques éléments de théorie cinétique	90
5.3.2	Cinétique de migration sous force seule	93
5.3.3	Cinétique de migration sous force et couple : asymétrie de la cinétique	97
5.3.4	Mise en équation de l'influence des contraintes de torsion sur la cinétique de migration	100
IV	Étude du complexe RuvAB	105
6	Activité du complexe RuvAB (article)	107
7	Rôle de la protéine RuvA	117
7.1	Cinétique de la migration en présence de RuvA	117
7.1.1	RuvA facilite la migration de la jonction	117
7.1.2	Recherche d'une éventuelle friction à la migration en présence de RuvA	118
7.2	RuvA empêche la formation de la jonction de Holliday	121
	Conclusions et perspectives	123
	Bibliographie	125

Introduction

Pour se perpétuer, un organisme vivant doit trouver un équilibre entre deux contraintes qui peuvent sembler paradoxales : il doit d'une part mettre en place des processus servant à maintenir et à conserver son information génétique, mais d'autre part, pour évoluer et s'adapter à son environnement, il doit aussi être capable d'accepter, voire de générer, une certaine variabilité de son information génétique. La recombinaison génétique est le processus moléculaire fondamental au cœur de ces questions : il s'agit d'un mécanisme d'échange d'information génétique entre molécules d'ADN portant des séquences homologues (c'est-à-dire similaires, mais pas nécessairement identiques). Cet échange permet tout d'abord de réparer une séquence d'ADN dégradée, par exemple en la comparant à une séquence identique mais intacte. Il permet aussi de générer de la diversité autrement que par des mutations seulement ponctuelles, mais en transmettant toute une séquence. Ce processus permet une exploration de l'espace des séquences beaucoup plus efficace pour générer une nouvelle information génétique avantageuse pour l'organisme.

Pour échanger une information génétique contenue dans la structure même de la molécule d'ADN, la recombinaison s'appuie d'une part sur la complémentarité des deux brins qui constituent la double hélice (et donc la redondance de l'information génétique), et d'autre part sur une structure d'ADN particulière : la jonction de Holliday. Il s'agit d'une structure d'ADN en croix qui joue un véritable rôle de carrefour moléculaire où peut se produire l'échange de simples brins entre deux molécules d'ADN. Cette structure peut également intervenir pour constituer un lien physique entre molécules d'ADN homologues.

L'importance de la manipulation de l'information génétique par l'organisme fait que cette structure intervient dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux comme la réparation de l'ADN, la réplication du génome ou la division cellulaire. De fait, la jonction de Holliday est un substrat pour de nombreuses protéines impliquées dans la régulation des processus de recombinaison génétique. Le complexe RuvABC, découvert chez la bactérie *Escherichia coli*, a été un des premiers à être identifié pour son activité spécifique sur la jonction de Holliday. Le rôle de ce complexe est double. Dans un premier temps, RuvAB agit sur la jonction de Holliday de façon à conduire l'échange des simples brins (processus également appelé «migration du point de branchement»). Cette activité constitue en fait un travail mécanique que le complexe réalise en consommant l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP : RuvAB est donc un moteur moléculaire. Ensuite, RuvC agit pour résoudre la jonction de Holliday en coupant l'une des deux paires de simples brins homologues et séparer ainsi les deux molécules d'ADN.

De nombreux aspects du complexe RuvABC et de son activité ont déjà été étudiés par les biologistes : mise en évidence d'un processus de migration et de résolution des jonctions de Holliday, analyse du rôle des différentes sous-unités dans ces activités, détermination de certaines structures pour les différentes sous-unités, étude des propriétés biochimiques du complexe telle que l'activité ATPase, études pour comprendre de quelle manière les activités de migration et de résolution peuvent s'insérer et intervenir dans des mécanismes plus globaux de recombinaison ou de réparation, etc.

En tant que physiciens, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au complexe RuvAB en tant que moteur moléculaire de la migration des jonctions de Holliday. Pour ce faire, nous avons mis en place une expérience de micromanipulation en «molécule unique» afin de pouvoir observer et caractériser l'activité du complexe sur une jonction de Holliday individuelle, et donc à l'échelle d'un complexe individuel. Ce type de technique permet de mesurer des propriétés du moteur inaccessibles par des expériences classiques de biologie moléculaire. Pour un moteur moléculaire, ces caractéristiques sont par exemple la vitesse, la processivité et la régularité du moteur, l'effet de la force sur la migration, la taille du pas élémentaire que fait l'enzyme au cours de l'avancée, etc. Ces informations contribuent à la compréhension du fonctionnement du complexe.

Nous avons également utilisé le même outil de micromanipulation afin d'étudier les mécanismes de formation et de migration des jonctions de Holliday sous l'influence des contraintes mécaniques.

Une première partie d'introduction dresse un bilan, non nécessairement exhaustif, des connaissances sur les jonctions de Holliday (chapitre 1) et sur le complexe RuvABC (chapitre 2). Cette partie a également été écrite dans l'idée de pouvoir servir de point de départ pour une recherche de références bibliographiques sur tel ou tel point précis.

La partie suivante (chapitre 3) décrit le principe de l'instrument que nous avons utilisé (une «Pince Magnétique») ainsi que le montage expérimental mis en place pour les expériences exposées par la suite.

La partie III présente deux premières séries d'expériences de micromanipulation de la jonction de Holliday. Dans un premier temps (chapitre 4) nous avons effectué des expériences dans des conditions où la jonction est facilement contrôlable (i.e. en absence d'ions magnésium). Nous avons alors appliqué la micromanipulation d'une jonction de Holliday à la détermination précise du pas de l'ADN en solution. Ensuite (chapitre 5) nous avons réalisé des expériences similaires de micromanipulation, mais cette fois-ci en présence d'ions magnésium. Nous avons tout d'abord étudié comment, dans ces conditions, la jonction de Holliday peut être formée à partir d'une molécule d'ADN de séquence entièrement palindromique. Puis nous avons effectué des mesures de cinétique de migration sous l'effet des contraintes mécaniques. Pour décrire les résultats des mesures de cinétique, nous avons développé un modèle du comportement de la jonction de Holliday. Cette modélisation nous a permis de rendre compte de l'influence des contraintes mécaniques sur le processus de migration de la jonction.

La dernière partie (partie IV) concerne le complexe RuvAB. Elle expose dans un premier temps les résultats expérimentaux obtenus sur l'activité du complexe RuvAB sur une jonction de Holliday individuelle (chapitre 6). Enfin, un retour est effectué sur les expériences de micromanipulation de la jonction de Holliday mais cette fois-ci en présence de la protéine RuvA (chapitre 7). Ces dernières mettent en avant le rôle de RuvA dans le processus de migration induit par RuvAB.

Première partie

Les jonctions de Holliday et le complexe RuvABC

Chapitre 1

Les jonctions de Holliday

1.1 L'ADN [1]

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est la molécule qui porte l'information génétique nécessaire à l'organisation et à l'activité cellulaire des organismes. Cette information est inscrite sous forme chimique : l'ADN est un polymère constitué par l'assemblage de nucléotides portant chacun l'une des quatre bases Adénine (A), Thymine (T), Guanine (G) ou Cytosine (C). C'est l'ordre d'apparition de ces bases le long du brin d'ADN qui constitue l'information génétique.

1.1.1 Structure de l'ADN

L'ADN est une molécule en double hélice formée de deux brins complémentaires et anti-parallèles (figure 1.1). Chaque brin est constitué d'un squelette sucre-phosphate où les sucres portent chacun l'une des quatre bases A, T, G ou C. Entre les deux brins de la double hélice les bases interagissent spécifiquement pour former uniquement des paires A-T ou G-C, maintenues grâce à des liaisons hydrogène qui assurent la cohésion entre les deux brins dont on dit qu'ils sont «hybridés». Ces liaisons sont au nombre de deux pour A-T et de trois pour G-C. C'est ce mode d'appariement unique qui assure la complémentarité des deux brins (connaissant la séquence portée par l'un des brins, on peut en déduire celle portée par l'autre). Enfin, du fait de l'asymétrie du ribose, le squelette sucre-phosphate des brins est orienté : on distingue pour chaque brin une extrémité 5' et une autre 3', et les deux brins complémentaires sont appariés de manière anti-symétrique (i.e. tête-bêche par rapport au sens du squelette).

La force de l'interaction entre deux bases complémentaires dépend du nombre de liaisons hydrogène établies. Ainsi, la paire GC est plus stable que la paire AT avec des énergies de liaison respectivement de l'ordre de $\sim 3 \text{ k}_B T$ et $\sim 1.5 \text{ k}_B T$. Concernant la géométrie (figure 1.1), le diamètre de la molécule est d'environ 2 nm pour un écart entre paires de bases d'environ 3.4 Å, et l'on compte environ 10.5 paires de bases par tour d'hélice. On peut également noter que par rapport à la surface formée par l'ensemble des paires de bases, il existe deux faces distinctes : un côté «grand sillon» où les paires de bases sont facilement accessibles, et un côté «petit sillon» où les paires de bases sont peu exposées.

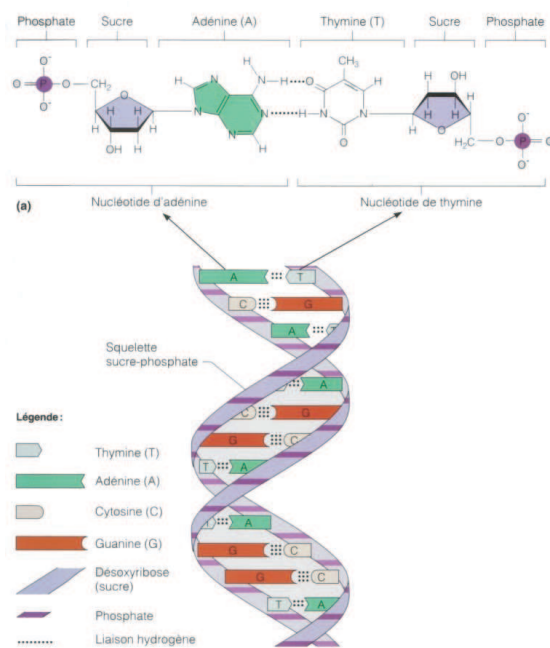


FIGURE 1.1 – *Structure de la double hélice d'ADN. Les deux brins sont complémentaires grâce à l'appariement des bases A avec T et G avec C. L'appariement des bases se fait au moyen de liaisons hydrogène (deux liaisons hydrogène pour la paire AT, et trois pour GC). Le diamètre de la molécule est d'environ 2 nm, la distance entre les paires de bases est de 3.4 Å, et la périodicité est d'environ 10.5 paires de bases par tour.*

1.1.2 Le code génétique

L'information génétique portée par l'ADN sert notamment à la synthèse des protéines dont la cellule a besoin. Les protéines sont en effet constituées d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés (chaînes polypeptidiques), repliées de façon spécifique pour être fonctionnelles. La position des acides aminés dans la chaîne est déterminée par la séquence d'ADN qui code pour la protéine en question. Les acides aminés utilisés par les cellules sont au nombre de vingt. Le code génétique (figure 1.2) établit la correspondance entre les triplets de bases (codons) le long de l'ADN et l'acide aminé à insérer dans la chaîne polypeptidique. A part quelques rares déviations, le code génétique est universellement conservé chez tous les organismes¹.

¹Il est à noter cependant que les mitochondries des cellules ont leur propre code génétique qui diffère très légèrement de celui utilisé dans le noyau des cellules (sauf chez les plantes où il est identique).

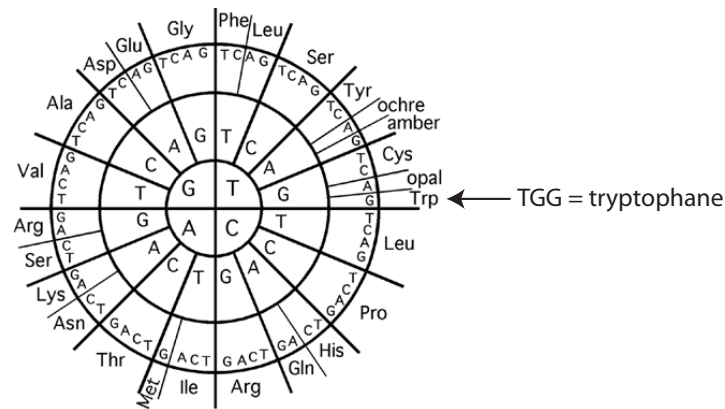


FIGURE 1.2 – Le code génétique. Chaque codon (ou triplet de nucléotides) se lit du centre vers l'extérieur, et code pour un acide aminé (par exemple, le codon TGG code pour le tryptophane). Certains acides aminés peuvent être codés par plusieurs codons différents : on dit que le code génétique est dégénéré. Il existe trois codons qui marquent la fin de la séquence d'une protéine : les codons STOP ambre (TAG), ocre (TAA) et opale (TGA)

1.1.3 Autres conformations possibles pour l'ADN

La structure en double hélice décrite ci-dessus est la conformation standard de l'ADN, dite ADN-B, qui se rencontre le plus couramment à l'état naturel dans les cellules. La double hélice peut néanmoins adopter de nombreuses autres conformations selon l'environnement, le solvant utilisé, les conditions de contraintes mécaniques, ou bien encore selon la séquence locale [2]. On dénombre ainsi par exemple, en plus de la forme B, les formes A, Z ou P (figures 1.3 et 1.4).

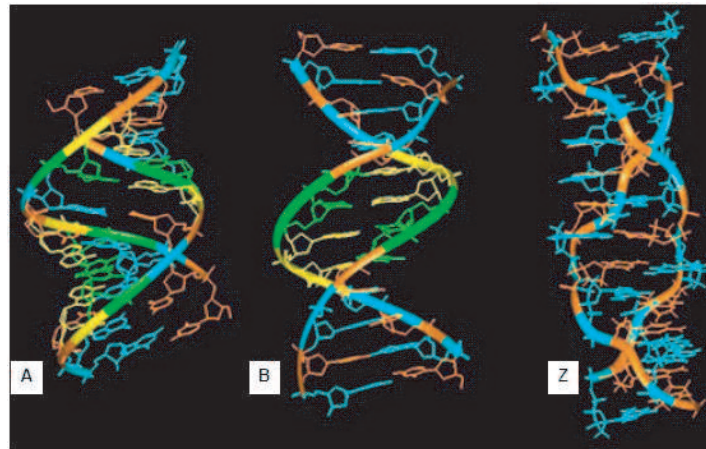


FIGURE 1.3 – Formes d'ADN A, B et Z (image extraite de [2]).

La forme A se rencontre essentiellement lorsque le milieu environnant contient peu d'eau (par exemple dans un solvant tel que l'éthanol) ; la double hélice de l'ADN-A est plus écrasée par rapport à la forme B : la distance entre les paires de bases est de 2.3 Å pour une périodicité de 11 paires de bases par tour. De plus, vue en coupe, la molécule

présente un axe creux, et le plan des paires de bases est incliné par rapport à cet axe central.

La forme Z diffère plus radicalement de la forme B, en particulier elle possède une hélicité gauche contrairement aux formes A ou B qui présentent une hélicité droite ; sa périodicité est de 12 paires de bases par tour et la distance entre paires de bases est de 3.8 \AA ; certaines séquences forment plus facilement de l'ADN-Z, en particulier celles où il y a alternance entre bases puriques et bases pyrimidiques [1].

Enfin, la forme P (figure 1.4), déduite de simulations numériques, s'obtient dans des conditions particulières de contraintes mécaniques [3], plus précisément lorsque la molécule d'ADN est soumise à une contrainte de torsion positive (i.e. dans le sens de son hélicité) tout en étant soumise à une force de traction empêchant que le sur-enroulement puisse être absorbé par la formation de plectonèmes. Dans la configuration P, les bases ne sont plus appariées car elles sont éjectées vers l'extérieur tandis que le squelette phosphate se retrouve au centre de la structure. La forme P est caractérisée par une périodicité d'environ 2.6 paires de bases par tour pour une distance base à base d'environ 6 \AA .

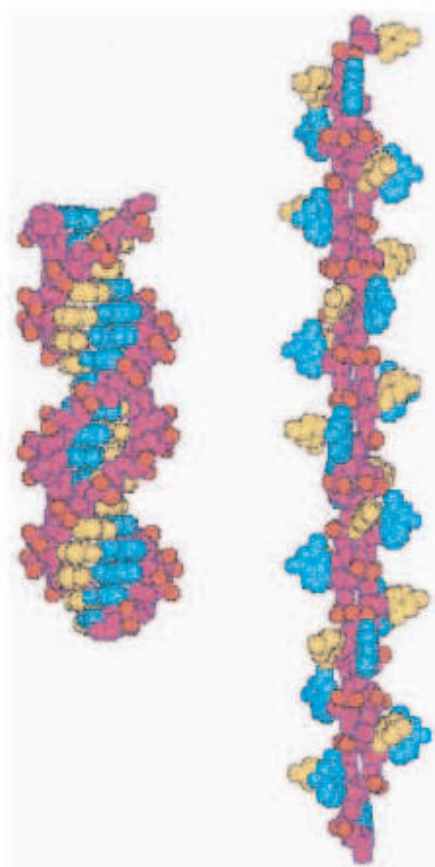


FIGURE 1.4 – Comparaison entre l'ADN-B - à gauche, et l'ADN-P - à droite (image tirée de [3]).

1.2 Le modèle initial de Robin Holliday

1.2.1 Le problème de la conversion de gène

Le modèle des jonctions de Holliday a été introduit pour la première fois il y a 40 ans par Robin Holliday [4], alors que celui-ci cherchait à expliquer le phénomène de la conversion de gène découvert à travers l'étude de nombreux champignons. La conversion de gène est un phénomène observé au cours de la méiose et qui se traduit par un déséquilibre dans la distribution des allèles effectivement transmis aux cellules haploïdes. La proportion normale 2 : 2 est celle où un allèle d'un chromosome se retrouve dans la moitié des cellules haploïdes, mais de temps en temps la proportion 1 : 3 est rencontrée. Pour rendre compte de ce déséquilibre, l'explication la plus généralement avancée partait de l'hypothèse que la réplication méiotique avait lieu en même temps ou après l'appariement des chromosomes, à la synapse de la prophase méiotique. La conversion était alors supposée résulter d'une erreur du système de réplication qui aurait pu passer d'un chromosome à l'autre au cours de la copie. Or ce modèle ne réussissait pas à expliquer la grande précision du processus et pourquoi ni délétion ni insertion n'accompagnaient la conversion de gène.

1.2.2 Une solution élégante

Pour pouvoir expliquer la grande fidélité de la conversion de gène, R. Holliday eut l'idée de faire appel à la complémentarité des deux brins de l'ADN. Il proposa alors un modèle d'échange de simples brins entre chromatides homologues (figure 1.5). Dans ce modèle, la conversion de gène résulte de la production de régions où les simples brins d'une chromatide sont appariés avec les simples brins complémentaires de l'autre chromatide. La longueur sur laquelle les brins sont échangés est déterminée par la distance sur laquelle le point de branchement s'est déplacé - on parle de migration du point de branchement (figure 1.6).

Au cours de cette migration, des mésappariements (par exemple un appariement AC au lieu d'un appariement AT ou GC) peuvent survenir là où les deux chromatides diffèrent (figure 1.7) ; la migration peut en effet se produire même si les doubles brins formés ne sont pas exactement complémentaires. Les mésappariements alors produits peuvent ensuite être reconnus par certaines protéines du système de réparation génétique de la cellule (comme par exemple la protéine MutS) qui peuvent ensuite déclencher des mécanismes spécifiques pour rétablir la complémentarité A-T et G-C des paires Watson-Crick en modifiant l'une ou l'autre des bases de la paire erronée. La conversion de gène résulte de cette réparation.

Ce mécanisme de conversion de gène, basé sur la complémentarité des deux brins de l'ADN, est particulièrement séduisant : premièrement il garantit le parfait alignement des séquences, expliquant ainsi la fidélité du mécanisme (absence de délétion ou d'insertion de séquence), de plus il explique que l'on puisse obtenir deux produits différents à l'issue de la recombinaison : avec ou sans «crossing-over» (figure 1.5).

Si l'on étudie plus précisément ce qui se passe au niveau de la séquence lors d'un échange de simples brins entre deux molécules d'ADN portant des séquences identiques (figure 1.6), on peut voir que le centre de la structure est un centre de symétrie pour les séquences portées par deux bras opposés (cette symétrie est équivalente à celle d'une séquence dite «palindromique»). L'échange des simples brins se fait alors dans ce cas par rupture et rétablissement des paires de bases identiques présentes au point de branchement

sur deux bras opposés de la jonction, et l'appariement des paires Watson-Crick reste alors conservé. On voit ainsi que le point de branchement se déplace le long de la séquence : on parle de «migration» du point de branchement (je reviendrai plus loin sur ce processus).

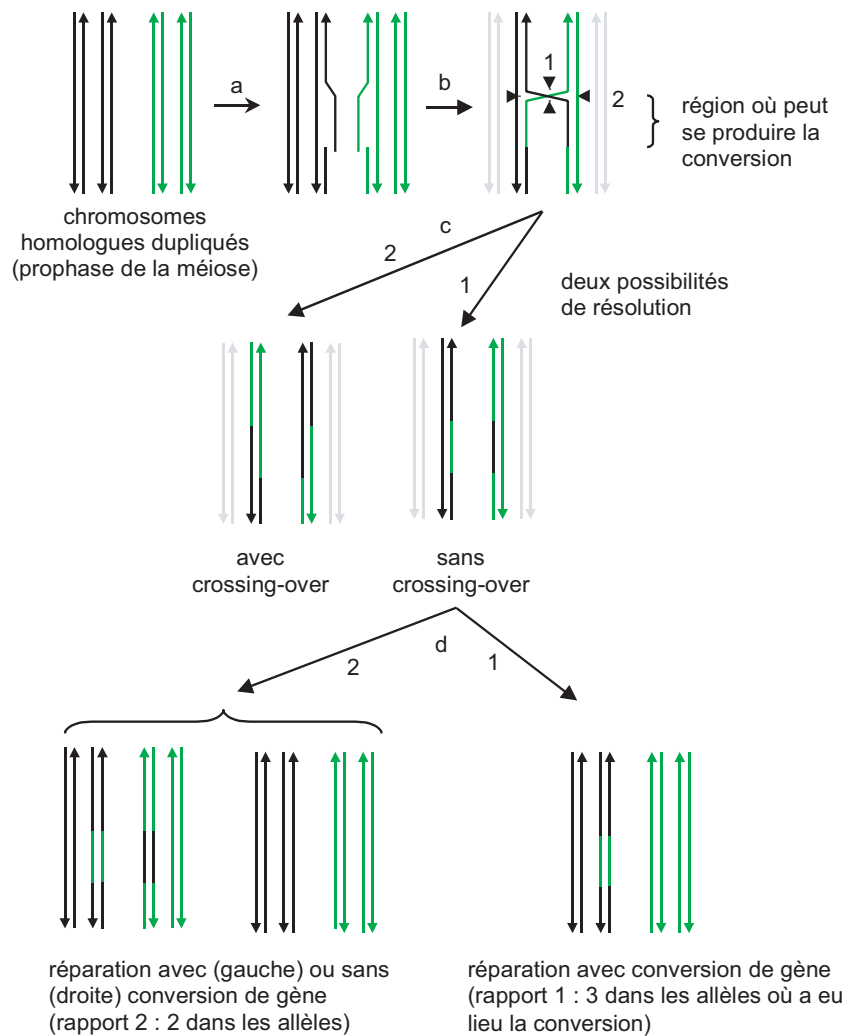


FIGURE 1.5 – Modèle pour la conversion de gène proposé par R. Holliday. (a) Au cours de la prophase, après duplication des chromosomes, des simples brins de deux chromosomes homologues de deux chromatides sœurs se séparent. (b) Les simples brins s'échangent pour former une jonction de Holliday. L'échange des simples brins produit, sur chacun des chromosomes impliqués, une région hétérologue où peut se produire la conversion de gène. (c) Résolution de la jonction donnant lieu à deux produits possibles selon les brins coupés : avec ou sans «crossing-over» (i.e. avec ou sans échange des extrémités des chromosomes). (d) Réparation des mésappariement éventuels, avec ou sans conversion de gène, et pouvant conduire à un déséquilibre dans le nombre final d'allèles.

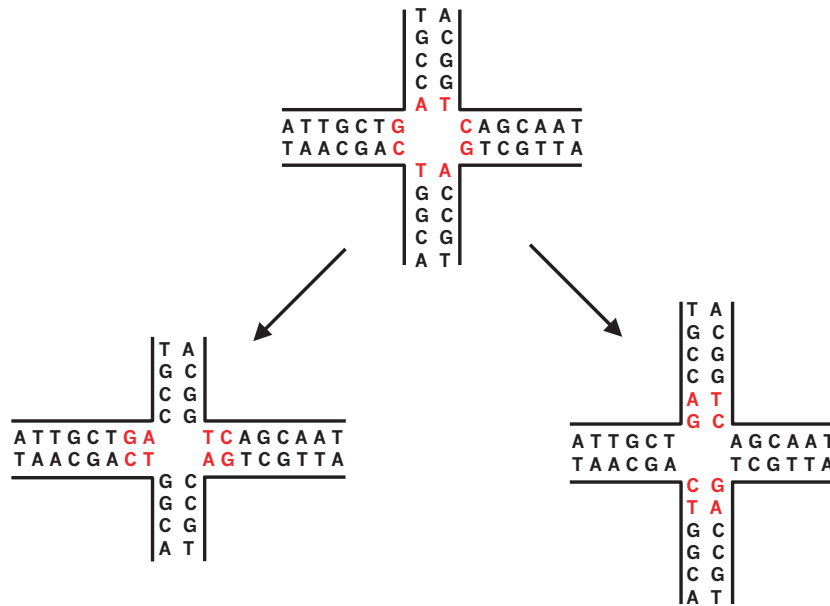


FIGURE 1.6 – Échange de simples brins entre deux molécules d'ADN portant des séquences homologues. Du fait de l'homologie, la séquence qui s'étend sur deux bras opposés de la jonction est symétrique par rapport au centre de la structure (on parle dans ce cas de séquence palindromique). Deux paires de bases colorées en rouge au cœur de la jonction montrent comment, du fait de la symétrie de séquence, l'échange des simples brins peut se faire dans un sens comme dans l'autre tout en respectant l'appariement Watson-Crick des paires de bases.

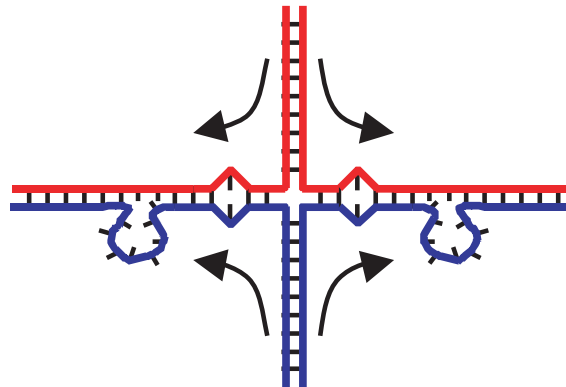


FIGURE 1.7 – Recombinaison entre molécules d'ADN portant des hétérologies de séquence. Les doubles hélices d'ADN hybrides bleues et rouges contiennent des mésappariements ou des zones d'insertion-délétion.

1.3 Les jonctions de Holliday et la recombinaison homologue

1.3.1 Preuves de l'existence des jonctions de Holliday

La jonction de Holliday est une structure d'ADN en croix qui résulte de l'échange de simples brins entre deux molécules d'ADN. Elle a tout d'abord été observée par microscopie électronique sur des intermédiaires de recombinaison chez des bactériophages [5] où chez les procaryotes [6]. Elle a ensuite été détectée chez les eucaryotes par l'apparition de molécules d'ADN branchées au cours de la méiose [7]. Par ailleurs, il a été montré que des contraintes de torsion exercées sur une fourche de réplication arrêtée pouvaient induire l'extrusion d'une jonction de Holliday par un «recul» de la fourche de réplication [8].

Une jonction de Holliday observée en microscopie électronique est représentée figure 1.8-a. À côté (figure 1.8-b) est schématisée la manière avec laquelle les simples brins sont connectés entre eux. La structure a la forme d'une croix dont les branches sont simplement de l'ADN double brin.

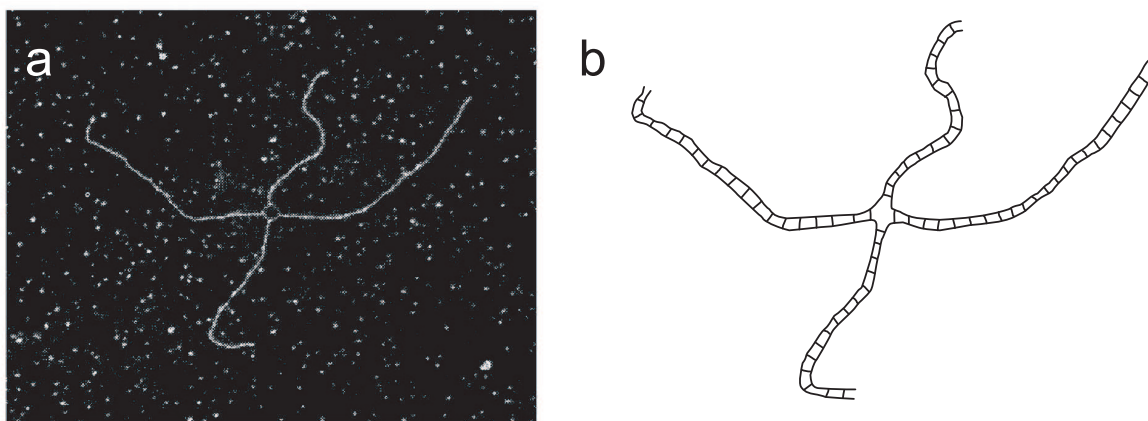


FIGURE 1.8 – Structure d'une jonction de Holliday. (a) Image d'une jonction de Holliday obtenue par microscopie électronique (tirée de [9]) (b) Schéma illustrant la connexion entre les brins qui s'échangent d'un bras à l'autre de la jonction. Par souci de clarté, l'hélicité de l'ADN n'est pas représentée.

1.3.2 Rôle général des jonctions de Holliday

Il est maintenant admis que le modèle de R. Holliday est effectivement mis en jeu dans le mécanisme à l'origine de la conversion génétique. Par ailleurs, il a été reconnu que la jonction proposée a un rôle plus général : elle est tout d'abord un intermédiaire essentiel dans la recombinaison homologue [7, 10–14]. Elle intervient également dans les mécanismes de recombinaison site-spécifique liés à la famille des intégrases [15–19]. Enfin, elle intervient dans certains mécanismes de réplication de l'ADN comme chez le bactériophage T4 [20].

La jonction de Holliday présente une double fonction : génétique d'une part (en permettant l'échange ou la comparaison d'information génétique entre molécules d'ADN

portant des homologies de séquence), et structurelle d'autre part (en constituant un lien physique entre molécules d'ADN homologues). Cette structure d'ADN en croix intervient au cours des processus cellulaires qui mettent en jeu la manipulation du génome. Elle est ainsi au cœur de mécanismes fondamentaux tels que la réparation de l'ADN, la division cellulaire, l'aide à la réplication, ou encore les mécanismes permettant la génération de la diversité génétique. De fait, elle est aussi un substrat pour de nombreuses protéines impliquées dans ces processus. La figure 1.9 illustre un schéma du mécanisme de recombinaison qui intervient dans le processus de réparation des cassures double brin avec, selon les organismes, certaines des protéines associées à chacune des étapes.

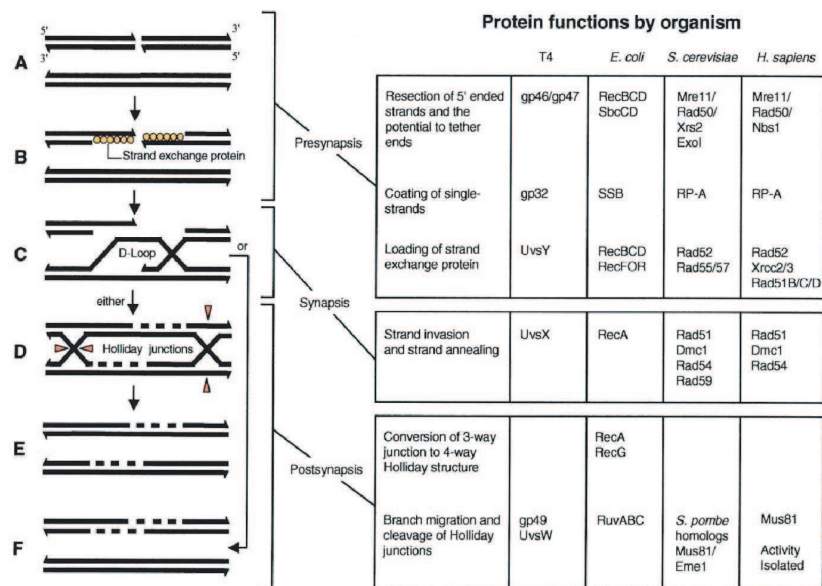


FIGURE 1.9 – *Recombinaison homologue et réparation des cassures double brin. Figure tirée de [21]. (a) Apparition d'une cassure double brin. (b) Digestion d'un des brins pour la préparation d'extrémités 3' simple brin cohésives. (c-d) Invasion d'une séquence homologue intacte par les extrémités simple brin. Synthèse du simple brin manquant, formation et migration de jonctions de Holliday. (e-f) Poursuite et achèvement de la synthèse des simples brins manquants, et résolution des jonctions de Holliday.*

1.3.3 Importance de la recombinaison homologue

La recombinaison homologue est un processus quasiment universel. Il est conservé à travers l'évolution et se rencontre chez tous les organismes, depuis les phages et les bactéries jusqu'à l'homme [21]. A l'appui, la protéine RecA (ou Rad51 chez l'homme), qui initie la recombinaison, est une des rares protéines dont la séquence est rencontrée chez tous les organismes vivants. Ceci souligne l'importance fondamentale de la recombinaison, dont le mécanisme est probablement aussi ancien que la réplication [22]. De ce fait les jonctions de Holliday et la façon dont ces structures interviennent dans le fonctionnement cellulaire sont des sujets d'étude importants pour comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces processus fondamentaux de manipulation du génome.

Il est difficile de rendre compte de toutes les façons par lesquelles la recombinaison homologue peut intervenir au cours des différents processus cellulaires. Ces dernières années il a été réalisé à quel point les différents processus liés à l'ADN (en particulier la réplication, la réparation et la recombinaison génétique par exemple) sont intriqués. Une bonne source d'information sur ce point est la série d'articles publiée dans le numéro du 17 juillet 2001 de PNAS à l'issue du colloque «Links between recombination and replication : vital roles of recombination» (voir [23] et les articles qui suivent dans le même numéro) Pour résumer, on pourra noter que la recombinaison homologue intervient dans les processus suivants :

- chez les organismes supérieurs, au cours de la méiose² : ségrégation des chromosomes homologues (importance mécanique de la jonction de Holliday) et remaniement des gènes pour constituer une combinaison unique à partir des gènes parents (importance génétique),
- chez les bactéries : échange horizontal (i.e. entre deux bactéries) de gènes (sorte de pendant au sexe pour générer de la diversité génétique),
- chez certains phages : rôle dans l'initiation de la réplication,
- enfin, plus généralement : rôle dans la réparation des cassures double brin de l'ADN, la restauration des fourches de réplication bloquées ou rompues, ou encore la maintenance des télomères.

Concernant les revues sur le sujet, aucune ne couvre l'ensemble des aspects de la recombinaison, on peut cependant en citer quelques unes qui l'abordent à chaque fois selon un éclairage particulier : la revue de Camerini-Otero et Hsieh est consacrée à la recombinaison homologue chez les eucaryotes et les procaryotes [24], les revues de Stephen C. West [25] et de Thomas Helleday [26] s'intéressent plus particulièrement aux mécanismes de la recombinaison chez les mammifères, celle d'Andrei Kuzminov [27] est consacrée à la réparation par recombinaison homologue chez la bactérie et le phage, celle de Kowalczykowski est consacrée au mécanisme chez *Escherichia coli* [28], et celle de Michael M. Cox [29] est plus particulièrement tournée vers le rôle de la recombinaison homologue au cours de la réplication. On trouvera également une série d'articles sur l'intrication réplication-recombinaison dans le numéro spécial du mois d'avril 2000 de TIBS [30–38].

1.4 Structure des jonctions de Holliday

1.4.1 La diversité des conformations accessibles

La structure de la jonction de Holliday est celle d'une croix dont les branches sont formées par des doubles hélices d'ADN et dont la cohésion est maintenue par la continuité des simples brins d'ADN qui s'échangent entre branches consécutives (figures 1.8 et 1.6). Cette structure est caractérisée par deux paramètres importants : l'empilement des paires de bases au niveau de la jonction, et le repliement de la structure [39].

La jonction de Holliday peut adopter une variété de conformations différentes en combinant les caractères «ouverte» ou «empilée», «parallèle» ou «anti-parallèle», et «droite» ou «gauche» (voir figure 1.10). L'existence de toutes ces conformations possibles pose la question de savoir la(les)quelle(s) sont rencontrées dans la cellule et à quel moment.

²mécanisme par lequel sont générées les cellules germinales qui serviront à la reproduction

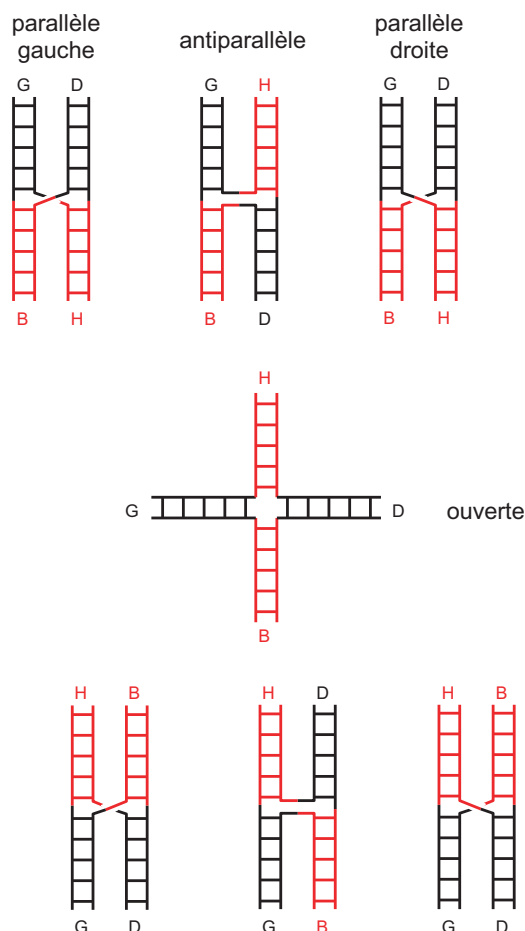


FIGURE 1.10 – Les différentes conformations que peut adopter la jonction de Holliday. On peut tout d'abord distinguer la conformation «ouverte» (au centre) des autres conformations dites «empilées». Dans ces dernières, deux bras successifs de la croix sont superposés pour maintenir la continuité de l'empilement des paires de bases à la traversée du point de branchement. Cet empilement peut être obtenu de deux façons différentes selon le choix des partenaires : empilement H-D et B-G (en haut), ou empilement H-G et B-D (en bas). Enfin, pour chaque conformation empilée, les deux axes formés par les branches empilées peuvent pivoter autour du point de branchement de façon à obtenir trois conformations extrêmes : «antiparallèle», «parallèle droite» ou «parallèle gauche». Ces conformations sont des situations limites mais l'angle de pivot peut prendre des valeurs intermédiaires.

1.4.2 Structure et dynamique des jonctions de Holliday

Les techniques utilisées pour l'étude des jonctions de Holliday

Un outil important d'étude de la structure des jonctions de Holliday est l'utilisation de petites jonctions synthétiques (quelques dizaines de paires de bases), immobiles, et assemblées à partir de 2 ou 4 oligonucléotides [40, 41].

De telles structures synthétiques sont très utiles pour étudier la structure et la dynamique des changements de conformation de la jonction de Holliday en fonction de

facteurs extérieurs. Différentes techniques ont ainsi été utilisées : des gels d'électrophorèse comparatifs [42–45], des mesures de FRET entre fluorophores fixés aux extrémités des bras de la jonction [46–49], des expériences de protection contre les radicaux hydroxyles [43, 45, 50–52], des mesures de biréfringence électrique transitoire [53], des mesures par RMN [54, 55] ou encore par des expériences de restriction par des enzymes spécifiques (comme MboII par exemple) [56].

Facteurs influençant la structure des jonctions de Holliday

Les expériences énoncées ci-dessus ont tout d'abord permis de montrer que l'empilement des bras est induit par la présence d'ions multivalents [47]. De plus, dans ces conditions, la jonction adopte une conformation antiparallèle droite [46] ; résultat qui a ensuite été confirmé dans des structures cristallines [57–59] (figure 1.11).

D'autre part, l'angle entre les paires de branches empilées est en général distribué autour d'une valeur d'environ 60° , correspondant à un alignement optimum des brins échangés (figure 1.12) [58–61]. La variabilité de l'angle autour de cette valeur est liée à la séquence, aux conditions ioniques [62, 63], ou encore au caractère flexible et dynamique des conformations qui peuvent donc être imposées par des contraintes [64–66].

Par ailleurs, il a été mis en évidence que le choix des partenaires d'empilement pour les bras dépend de la séquence locale (2 à 3 paires de bases) autour du point de branchement [42, 48, 54]. En fait, il a été constaté qu'il peut éventuellement exister une distribution entre deux populations ayant des empilements différents [54], et que cette distribution résulte d'un équilibre dynamique par isomérisation de la structure [45, 48, 49, 55].

D'autre part, il a été montré, par l'utilisation de molécules contenant deux jonctions, que la conformation d'une jonction pouvait être imposée par des contraintes stériques [52]. Plus précisément, ces études ont montré qu'on pouvait forcer la jonction à adopter une conformation parallèle, et qu'en relâchant la contrainte, la jonction était capable de s'isomériser pour passer à une conformation antiparallèle standard.

Enfin, la présence de mésappariements [43] (qui peuvent survenir au cours d'échange de brins portant des séquences pas totalement identiques) ou la présence de coupures simple brin [44] induisent des contraintes stériques qui peuvent aussi influencer sur la conformation de la jonction.

Conformation à bas sel

Concernant la conformation en l'absence d'ions divalents, on pourrait penser qu'en raison de l'absence d'écrantage des répulsions électrostatiques, les bras, chargés négativement, adoptent une conformation tétraédrique de façon à obtenir un écart maximum entre chaque branche. Cependant, la jonction présente deux faces non équivalentes : une face ouverte sur le grand sillon et l'autre ouverte sur le petit sillon, ce qui pourrait entraîner une conformation pyramidale. En fait, il a été montré (par gels d'électrophorèse [42, 67] et par FRET [68]) que la conformation de la jonction dans ces conditions est approximativement plane et à symétrie carrée (figure 1.12). Cette conformation apparaît comme un compromis entre les structures tétraédrique et pyramidale et elle reflète sans doute, de part sa symétrie, la grande souplesse de la structure en l'absence d'ions divalents.

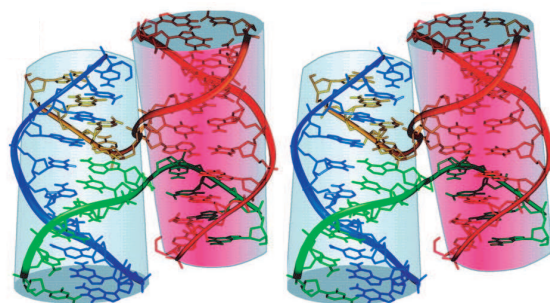


FIGURE 1.11 – Image stéréoscopique d’une jonction de Holliday obtenue d’après une structure cristallographique [59]. La jonction est en conformation parallèle droite. Deux bras successifs de la jonction sont agencés de façon à ce que l’empilement des paires de bases reste conservé même au passage du point de branchement.

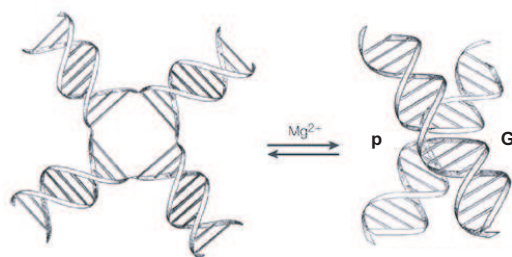


FIGURE 1.12 – Équilibre entre conformation ouverte et conformation empilée antiparallèle. Sur cette dernière, on peut distinguer deux faces : l’une côté grand sillon (G), l’autre côté petit sillon (p). L’angle entre les deux axes est d’environ 60° . On note l’alignement des deux simples brins qui s’échangent au niveau du point de branchement. (Illustration tirée de [22])

Finalement, l’équilibre entre conformation empilée et conformation étendue vient des effets opposés entre d’une part la répulsion électrostatique, et d’autre part la tendance à l’empilement des paires de bases. Les répulsions électrostatiques proviennent principalement du rapprochement des groupes phosphates côté petit sillon de la jonction, lorsque celle-ci est sous sa conformation empilée [58,59]. La présence d’ions permet donc d’écranter les charges et autorise ainsi l’empilement de la jonction - partiellement à haute concentration en ions monovalents et de façon plus efficace en présence d’ions magnésium ou d’hexamine cobalt(III). Les études montrent que, contrairement aux ions monovalents, ces derniers composés se fixent à des sites spécifiques au sein de la jonction [59,69–73].

1.5 Migration du point de branchement

1.5.1 La migration spontanée

Le processus de migration de la jonction de Holliday a été démontré pour la première fois *in vivo* chez des bactériophages lors de la recombinaison [5, 10, 74] ou au cours de l'infection de la bactérie *E. coli* [75]. De manière générale, la distance sur laquelle la jonction migre détermine la quantité d'information génétique échangée pendant la recombinaison, il est donc intéressant d'étudier la cinétique d'un tel processus.

Le mécanisme d'échange de simples brins entre molécules d'ADN portant des séquences identiques a été décrit précédemment. Dans ce cas, nous avons vu qu'au cours du déplacement du point de branchement, l'appariement des paires de bases est conservé du fait de la symétrie de séquence ; il s'agit donc d'un processus isoénergétique. D'autre part, si l'on exclue les éventuels effets de séquence, il est clair que l'échange des paires de bases peut se faire aussi bien dans un sens que dans l'autre. Un tel modèle présente donc toutes les caractéristiques d'une marche aléatoire à une dimension (c'est à dire d'un mécanisme de diffusion) avec une énergie d'activation nécessaire pour rompre puis reformer les paires de bases à échanger. On parle alors de «migration spontanée».

Il faut toutefois noter tout d'abord qu'un tel mécanisme de diffusion est peu efficace au regard de la nécessité pour un organisme vivant de pouvoir réaliser les processus biochimiques de façon rapide et spécifique. De plus l'échange de simples brins entre molécules d'ADN de séquences parfaitement identiques ne présente en soit aucun intérêt du point de vue de l'échange d'information génétique puisque les molécules d'ADN résultant de la recombinaison sont alors exactement les mêmes que celles de départ ; c'est au contraire dans le cas où il y a des hétérologies de séquence qu'un tel échange peut être intéressant (notamment dans les problèmes de réparation de séquences altérées). *In vivo*, des protéines vont en fait être impliquées dans un tel processus, à la fois pour favoriser la migration de la jonction dans une direction préférentielle (et non une diffusion aléatoire du point de branchement) mais aussi, dans le cas de la présence d'hétérologies de séquence, pour aider à franchir les barrières énergétiques dues à la formation de mésappariements.

Néanmoins, pour comprendre le rôle des protéines de recombinaison dans la catalyse de ce processus, il est intéressant de comprendre auparavant le mécanisme de la migration spontanée (en l'absence de protéines) et sa cinétique intrinsèque.

1.5.2 Deux conventions pour la définition de la vitesse de migration

Il est important de bien préciser dès à présent la convention adoptée ici et dans toute la suite pour la définition de la vitesse de migration.

Il existe deux conventions possibles pour définir la vitesse de migration (voir figure 1.13). La première façon consiste à mesurer la variation de l'envergure de la croix, c'est-à-dire la variation de la somme des longueurs de deux bras symétriques (i.e. homologues). Dans cette convention, quand le point de branchement se déplace d'une paire de bases par rapport à la séquence, il en résulte, du fait de la symétrie de la structure, une variation de longueur de **deux** paires de bases pour l'envergure de la croix. La seconde façon consiste à prendre comme référence la position de la jonction par rapport à la séquence, et dans

ce cas le même déplacement correspond à **une** paire de bases. Les vitesses mesurées sont donc dans les deux cas exprimées en paires de bases par seconde, mais pour une même cinétique la première définition donne une vitesse double de la deuxième. Étant donné que la grandeur biologique importante est effectivement la quantité d'information échangée, la seconde définition, qui mesure la position de la jonction par rapport à la séquence, est la plus pertinente. Néanmoins les deux définitions peuvent être utilisées et il est important de garder cette information à l'esprit, notamment lorsqu'il s'agit de comparer des mesures trouvées dans la littérature.

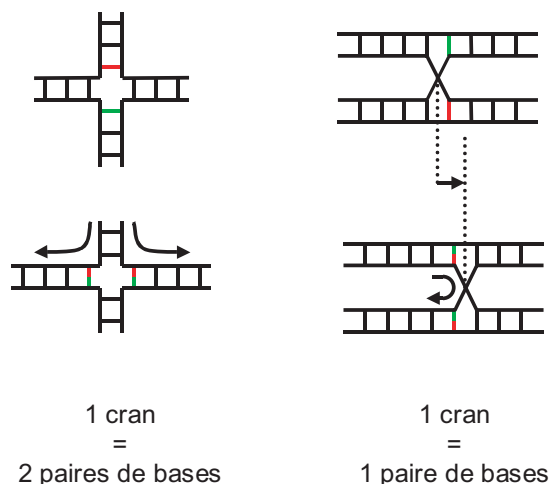


FIGURE 1.13 – Les deux conventions possibles pour la définition de la vitesse de migration. Les parties à droite et à gauche sont deux façons de représenter un même mouvement du point de branchement. A gauche, lorsque le point de branchement se déplace d'une paire de bases dans la séquence, deux paires de bases s'échangent entre les bras verticaux et horizontaux de la jonction, on mesure donc une variation de longueur de deux paires de bases pour l'envergure de la croix (somme des longueurs de deux bras homologues). A droite, on a représentée la jonction en plaçant les deux molécules d'ADN homologues de manière parallèle : le même déplacement que sur la figure de gauche apparaît bien ici comme un déplacement d'une paire de bases (une paire de bases pour chaque brin homologue). La grandeur biologique importante étant la quantité d'information génétique échangée, nous adopterons la convention de droite, qui mesure la vitesse de déplacement de la jonction par rapport à la séquence.

1.6 Cinétique des changements de conformation et de la migration spontanée

1.6.1 Mesure du temps caractéristique de la migration - effet du magnésium

Un processus de marche aléatoire comme celui de la migration spontanée est caractérisé d'une part par la taille du pas élémentaire et d'autre part par son temps (ou sa fréquence) caractéristique, qui est le temps moyen que la jonction met pour faire un pas (temps moyen par «pas»). La taille de ce «pas» ne peut pas être définie a priori car rien ne permet d'exclure que la jonction puisse se déplacer de plusieurs paires de bases d'un coup. Cependant, nous verrons plus loin que plusieurs indices suggèrent que le pas est effectivement d'une paire de bases, c'est ce qui est généralement admis et c'est donc ce que nous supposons ici.

Les mesures précises du temps caractéristique du processus de migration ont été laborieuses. Une première estimation théorique a été obtenue par des arguments d'hydrodynamique sur un modèle très simplifié de migration où seul l'effet de la viscosité sur un ADN en rotation selon son axe était considéré [76]. Cette estimation a donné pour le temps caractéristique une limite inférieure due à la viscosité : 20 μ s. Ensuite des travaux expérimentaux ont été réalisés pour mesurer le temps de dissociation d'intermédiaires de recombinaison chez le phage G4. La valeur du temps caractéristique déduite de ces travaux était plus grande : 170 μ s et 100 μ s [77, 78].

Par la suite, des études plus systématiques sur la dissociation d'intermédiaires de recombinaison artificiels ont permis d'obtenir des mesures plus claires et aussi de comprendre l'influence de certains paramètres sur la cinétique de la migration, et en premier lieu l'effet des ions magnésium [79–81]. Plus précisément, les valeurs obtenues pour le temps caractéristique étaient de 270 – 300 ms en présence de 10 mM Mg^{2+} contre 0.3 – 0.4 ms en l'absence d'ions divalents. Ces résultats étaient en accord avec d'autres estimations [82, 83], et expliquaient la dispersion et les valeurs obtenues lors des expériences précédentes [77, 84]. En effet, ces dernières avaient été faites soit en présence d'EDTA qui chélate les ions divalents, soit en présence de magnésium. Une confirmation est d'ailleurs venue de l'équipe de R.C. Warner qui, en revenant sur leurs premières mesures [77], a réalisé qu'elles sous-estimaient de trois ordres de grandeur le temps caractéristique du processus de diffusion, en raison de l'effet de la présence d'EDTA et d'un effet catalytique dû à la présence de protéines (comme par exemple *EcoRI*) dans leur préparation [83].

L'effet du magnésium à la fois sur la conformation de la jonction de Holliday et sur la cinétique du processus de migration suggère une relation de cause à effet entre les phénomènes. Pour étudier de plus près cette hypothèse, l'équipe de Peggy Hsieh a étudié l'effet de la concentration en ions magnésium à la fois sur la cinétique de dissociations d'intermédiaires de recombinaison artificiels et sur la structure d'une jonction synthétique immobile [81]. Cette étude a permis de montrer que le passage de la conformation ouverte à la conformation empilée se fait à une concentration en ions magnésium (entre 100 μ M et 300 μ M) où l'augmentation du temps caractéristique de la migration est la plus forte, passant de 0.48 ms à 12 ms. Ce résultat confirme donc la corrélation entre les deux effets.

Cette corrélation suggère soit que la barrière d'énergie à franchir est plus importante lorsque la jonction est en conformation empilée (car, pour l'échange des paires de

bases, il faut alors fournir de l'énergie afin de rompre temporairement l'empilement des bases au niveau de la jonction) soit que la conformation ouverte est un intermédiaire de réaction nécessaire à l'échange des paires de bases mais qui devient peu fréquent en présence d'ions magnésium (ce qui limite la probabilité temporelle d'un échange de paire de bases). Dans ce dernier cas les fluctuations thermiques sont moins efficaces à provoquer le franchissement de la barrière d'énergie : la limitation cinétique est donc essentiellement d'origine entropique plutôt que d'origine énergétique. Nous verrons plus loin, au paragraphe 1.6.3, que c'est cette dernière hypothèse qu'il faut retenir.

1.6.2 Effet des hétérologies de séquence - le pas de la migration (1)

Des études ont également été faites pour déterminer l'effet des hétérologies de séquence sur le processus de migration, et plus particulièrement l'effet d'un seul mésappariement. Cette question est intéressante puisqu'elle est reliée directement à la fonction d'échange d'information génétique qu'assure la jonction de Holliday. Il a ainsi pu être montré qu'une seule paire de bases d'hétérologie entre les deux molécules d'ADN engagées dans la recombinaison suffit à bloquer l'échange spontané des simples brins [79, 85]. Un tel blocage peut s'expliquer par l'existence d'une barrière à la migration, qui peut être à la fois stérique et énergétique du fait de l'apparition d'une paire de bases mésappariée dans chacun des deux doubles brins recombines. En effet, le mésappariement peut d'une part induire localement une déformation de la double hélice (d'autant plus si l'échange des simples brins place par exemple face à face deux bases puriques (A ou G) qui portent chacune un groupement à deux cycles (voir figure 1.1) et pourraient être trop volumineuses pour l'espace disponible entre les deux squelettes phosphates) et d'autre part, le non-respect des liaisons hydrogène réduit la stabilité énergétique de la paire de bases mésappariée. Il faut donc dans ce cas, pour franchir l'hétérologie, payer environ deux fois l'énergie d'appariement d'une paire de bases car deux paires hétérologues sont formées. Le fait qu'une seule paire de bases hétérologue bloque la migration du point de branchement suggère que le pas de la migration ne peut être que de l'ordre d'une à deux paires de bases au maximum [79].

La migration spontanée peut donc se faire librement jusqu'à rencontrer une hétérologie de séquence. Le mésappariement peut alors constituer une barrière de réflexion qui contraint la jonction à diffuser d'un seul côté du mésappariement. Au final, l'étendue sur laquelle le point de branchement est autorisé à diffuser librement est donc limitée par la taille de la région d'homologie, qui peut éventuellement être réduite à zéro dans le cas d'une jonction immobile prise entre quatre bras qui ne partagent pas d'homologie de séquence [40] (un tel cas n'est généralement pas naturel mais obtenu artificiellement).

1.6.3 Paysage énergétique - le pas de la migration (2)

Une première mesure des énergies mises en jeu au cours de la migration spontanée des jonctions de Holliday fut obtenue par l'équipe de Hsieh [80]. En modélisant par une loi d'Arrhenius (voir équation (5.2) page 90) la cinétique de dissociation d'un intermédiaire de recombinaison synthétique, et en étudiant l'effet de la température sur la cinétique de dissociation d'intermédiaires de recombinaison, ils ont pu mesurer la valeur de l'énergie d'activation du processus de migration : $E_a = 155 \text{ J/mol} = 60 \text{ k}_B\text{T}$. Le point particuliè-

rement remarquable est que cette énergie d'activation ne dépend pas de la présence ou non d'ions magnésium, ce qui suggère que les états intermédiaires sont les mêmes dans les deux cas. L'effet des ions magnésium est donc essentiellement entropique et influe principalement sur le facteur pré-exponentiel A (voir équation (5.2)).

Une autre étude cinétique et thermodynamique du processus de migration a d'ailleurs été abordée avec une approche expérimentale équivalente par l'équipe de R.C. Warner [83] qui avait déjà réalisé les premières tentatives de mesures de cinétique. Cette étude a confirmé les résultats des mesures cinétique et thermodynamique de l'équipe de Hsieh : une valeur semblable a été trouvée pour l'énergie d'activation ($E_a = 57 \text{ k}_B\text{T}$), et l'indépendance de cette valeur vis-à-vis de la présence des ions magnésium a été confirmée.

Par ailleurs, des études de cinétique de changement de partenaires d'empilement sur des jonctions de Holliday immobiles ont été réalisées par RMN [55] ou en utilisant une technique de FRET entre fluorophores fixés aux extrémités des bras de la jonction [49, 86].

En présence d'ions magnésium et de sel, les constantes cinétiques de changement de partenaires d'empilement sont de l'ordre de $2 \text{ à } 20 \text{ s}^{-1}$ (dépendant de la concentration des ions). Elles sont donc significativement plus élevées que la fréquence caractéristique d'échange de paires de bases : 0.7 s^{-1} [80, 83]. Or, ces changements de conformation passent nécessairement par une conformation ouverte, ce qui renforce l'idée que cette dernière est l'état intermédiaire rencontré au cours du processus de diffusion.

On peut également en déduire une énergie d'activation (enthalpie libre) nécessaire au passage de la conformation empilée à la conformation ouverte en présence de magnésium : $E_a = 100 \sim 120 \text{ kJ/mol} \equiv 38.8 \sim 46.5 \text{ k}_B\text{T}$ [49]. Cette valeur correspond à peu près à 2 fois l'enthalpie libre d'empilement entre deux paires de bases : $16 \text{ k}_B\text{T}$ [87] ; elle est donc compatible avec la rupture de deux empilements entre bras consécutifs.

Pris ensemble, ces résultats montrent (i) que c'est le même mécanisme de migration qui est à l'œuvre indépendamment des conditions ioniques, (ii) que le pas de la migration est très certainement d'une seule paire de bases en présence d'ions magnésium, ce qui laisse penser, en raison de (i), que c'est également le cas en l'absence d'ions divalents, et (iii) que l'intermédiaire réactionnel commun est bien la conformation ouverte (voir figure 1.14). La cinétique plus lente en présence d'ions magnésium est alors due à la prédominance des conformations empilées sur la conformation ouverte, et donc à un effet entropique (et non énergétique) qui diminue la fréquence à laquelle l'intermédiaire (la conformation ouverte) est rencontrée, et donc par conséquent la fréquence avec laquelle l'échange de paires de bases peut se produire.

Il est donc maintenant possible de dresser tout d'abord un schéma général du processus de migration avec la conformation ouverte comme état intermédiaire. Ce schéma est décrit figure 1.14. De plus un diagramme énergétique peut être tracé semi-quantitativement : voir figure 1.15.

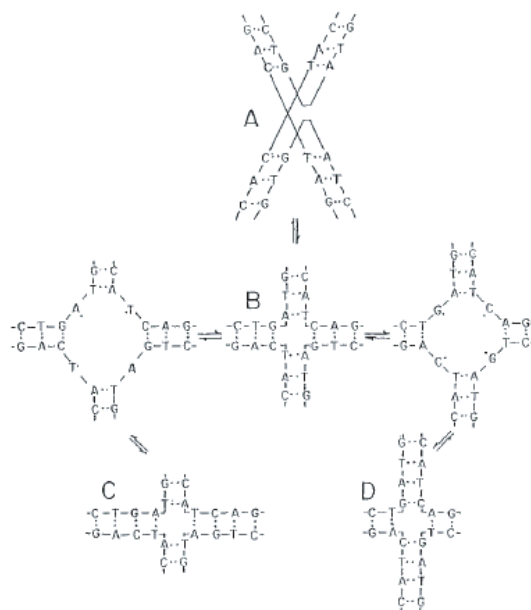


FIGURE 1.14 – Schéma général pour le processus de migration spontanée de la jonction de Holliday (diagramme tiré de [83]). En présence d'ions multivalents, la jonction adopte une conformation empilée (A). La conformation ouverte (B) est la conformation dominante en l'absence d'ions multivalents, et elle est obtenue plus rarement et de façon transitoire en présence d'ions multivalents (comme par exemple au cours d'un changement de partenaires d'empilement par isomérisation). Cette conformation ouverte est l'intermédiaire réactionnel par lequel la jonction doit nécessairement passer pour permettre à deux paires de bases de s'échanger (B vers C ou B vers D). Au cours de cet échange, la jonction passe par un état de transition (avec les bases du centre désappariées) qui constitue la barrière énergétique associée à la migration.

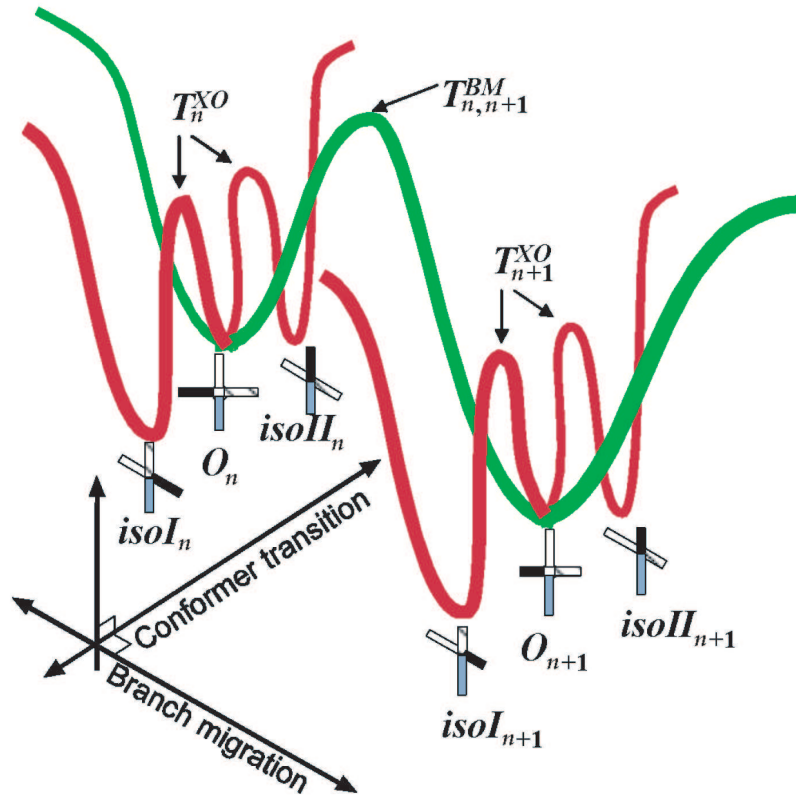


FIGURE 1.15 – Paysage énergétique de la jonction de Holliday en fonction des changements conformationnels et de l'avancée de la migration (diagramme tiré de [49]). *isoI* et *isoII* sont les deux conformations d'empilement associées aux deux choix possibles de partenaires (voir figure 1.10). *O* est la conformation ouverte. T^{XO} est l'état de transition associé au passage entre la conformation empilée (*X*) et la conformation ouverte (*O*) (chemin rouge). T^{BM} est l'état de transition à franchir lors d'un échange de paire de bases (passage de la position n à $n + 1$: chemin vert). Les niveaux énergétiques dépendent des conditions ioniques.

Chapitre 2

Le Complexe RuvABC

La migration des jonctions de Holliday, lorsqu'elle se fait spontanément par diffusion, est un processus peu efficace (voir chapitre 1) : il est de caractère stochastique, lent dans les conditions physiologiques (300 ms pour échanger une paire de bases), et enfin les hétérologies de séquence sont quasiment infranchissables de manière spontanée. Ces propriétés sont finalement incompatibles avec les besoins d'une cellule de pouvoir réaliser les processus biochimiques de façon rapide et spécifique. Pour pouvoir être utile, un tel mécanisme nécessite donc l'action de protéines spécifiques.

Du fait de son rôle fondamental, la jonction de Holliday est un substrat pour de nombreuses protéines (figure 1.9). On compte notamment RecG [88–90], le complexe RecBCD [91], le complexe RuvABC [92], ou encore les protéines de la famille RecQ [21, 22, 93]. Parmi ces protéines, certaines ont un rôle qui peut se recouvrir, ce qui est par exemple le cas avec les complexes RecG et RuvABC [94] qui interviennent au cours de la recombinaison homologue chez la bactérie *Escherichia coli*.

Parmi ces protéines, certaines, comme le complexe RuvAB, ont pour rôle spécifique de catalyser la migration de la jonction de Holliday de façon à produire un déplacement net du point de branchement. Cette activité se traduit par un travail mécanique : il faut tout d'abord déplacer physiquement les brins d'ADN au travers de la jonction. D'autre part il faut déplacer les éventuels complexes protéiques qui, chargés sur le double brin d'ADN, pourraient empêcher la migration. Les protéines qui catalysent la migration constituent donc essentiellement des moteurs moléculaires : elles consomment de l'énergie chimique (comme par exemple l'ATP) pour produire un travail mécanique.

Mon travail de thèse a porté sur l'étude des protéines RuvA et RuvB. Ce choix a été motivé par le fait que notre approche en molécule unique était relativement nouvelle pour ce qui est de l'étude de la jonction de Holliday. Nous avons donc choisi tout d'abord d'étudier un système de la bactérie *E. coli* qui est l'un des organismes les plus étudiés, et plus particulièrement le complexe RuvAB qui a été relativement bien caractérisé.

Avant de rappeler ce qui est connu du complexe RuvABC, il est utile de souligner qu'il est toujours difficile de faire un bilan des connaissances sur des sujets en constante évolution et où les connaissances et les idées, bien que déjà très avancées, restent néanmoins partielles et sont régulièrement remodelées par de nouvelles découvertes. Il est

évidemment difficile d'entrer systématiquement dans le détail de chacun des travaux qui ont contribué à dresser ce tableau des connaissances. Mais surtout, il est encore plus délicat d'assembler des résultats obtenus souvent dans des conditions différentes, ou qui ne reflètent la plupart du temps qu'une vision partielle des choses.

J'ai tout d'abord tenté ici de regrouper ensemble les résultats qui ont permis de dresser sur certains points une image relativement précise (et acceptée) des phénomènes mis en jeu. J'ai également essayé de rappeler les résultats qui à eux seuls ne permettent pas encore de conclure sur tel ou tel point, ou qui, du fait de la complexité du système étudié ici, ne donnent parfois pas encore une image cohérente.

Ce bilan est incomplet à de nombreux points de vue, notamment en ce qui concerne l'interaction de RuvAB avec d'autres facteurs de la recombinaison ou de la réparation, mais aussi sa place par rapport aux différentes voies («pathway») possibles de la recombinaison homologue. De plus, bien que cela eut été intéressant, il n'est pas fait ici de bilan des similitudes et différences entre l'activité de la protéine de *E. coli* et ses homologues trouvés chez d'autres organismes. De même, la comparaison avec d'autres hélicases hexamériques reste réduite. Je me suis cependant attaché à rassembler tout ce qui pouvait aider à comprendre le fonctionnement du complexe dans le cadre des expériences en molécule unique, et pouvant être utile à une interprétation des résultats obtenus.

2.1 Le locus *ruv*

2.1.1 Identification des 3 gènes *ruvA*, *ruvB* et *ruvC*

Les gènes codant pour les protéines RuvA, RuvB et RuvC [95] ont été identifiés grâce à l'isolation de mutants de *E. coli* sensibles aux UV [96], défectueux dans la réparation de l'ADN et la recombinaison génétique [97–99], ou encore dans la division cellulaire. Dans ce dernier cas, la déficience conduit à la formation de chromosomes liés de façon covalente et entraînant la formation de filaments multinucléaires non séparés [96]. Des mutations dans les gènes *ruv* ont un effet important surtout en association avec des mutations sur d'autres gènes tels que *recG*, *recBC sbcA* et *recBC sbcBC* [95]. Cependant, RuvC est spécifiquement requise pour la réparation des dommages causés par les UV à l'ADN [100]. Par ailleurs, il est à noter qu'une surexpression de RuvA entraîne une sensibilité extrême aux UV [99].

Par la suite, des homologues de RuvA et RuvB ont été identifiés chez d'autres organismes comme *Thermus thermophilus* [101–103], *Mycobacterium leprae* [104], *Mycoplasma pneumoniae* [105] ou *Pseudomonas aeruginosa* [106].

2.1.2 Régulation de l'expression des gènes *ruv*

Chez *E. coli*, les gènes *ruvA* et *ruvB* forment un opéron sous contrôle du répresseur LexA, et sont ainsi régulés par la réponse SOS [107–109] (figure 2.1). Par défaut, les taux d'expression des protéines RuvA et RuvB s'élèvent respectivement à environ 700 et 200 molécules par cellule, et peuvent monter respectivement jusqu'à environ 5600 et 1600 molécules par cellule en cas d'induction par la réponse SOS [95]. En revanche, le gène de la protéine RuvC n'est pas sous contrôle de la réponse SOS [110], et la protéine s'exprime à un faible niveau de 100 molécules par cellule [95, 100]. Il est à noter que chez certains

organismes, comme par exemple chez *Pseudomonas aeruginosa*, les gènes *ruvA* et *ruvB* ne sont pas régulés par la réponse SOS [106].

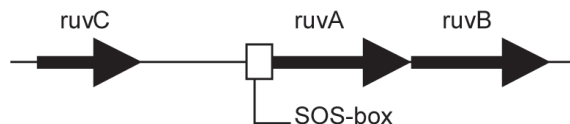


FIGURE 2.1 – Disposition des gènes *ruvA*, *ruvB* et *ruvC* sur le chromosome d'*E. coli*. Le gène *ruvC* est constitutivement exprimé, tandis que *ruvA* et *ruvB* sont induits par la réponse SOS et régulés par l'opéron *LexA* [95].

2.1.3 Rôles biologiques connus pour les gènes *ruv*

Concernant leurs fonctions générales [111], les protéines RuvA, RuvB et RuvC interviennent à la fin du processus de recombinaison [98], qui peut être initié par RecA à partir d'une extrémité simple brin [112]. En présence d'ATP, RuvAB agit pour catalyser l'échange de brins dans les intermédiaires de recombinaison (jonctions de Holliday) de façon plus efficace que RecA [113]. De plus, avec RuvC, le complexe participe à la formation de molécules d'ADN hétéroduplexes et à la résolution des intermédiaires de recombinaison en produits de recombinaison matures [114] (résolution des jonctions de Holliday). Par ailleurs, RuvA, RuvB et RuvC sont susceptibles d'intervenir dans certaines voies de réparation des fourches de réplication arrêtées [115].

Comme il a été mentionné ci-dessus, les protéines Ruv ne constituent pas la voie unique pour agir sur les jonctions de Holliday et d'autres protéines sont impliquées dans cette activité comme par exemple la protéine RecG [116–118].

2.2 RuvA

2.2.1 Description de RuvA

RuvA est une protéine de 22 kDa qui s'assemble en tétramères stables en solution [108,113,119,120]. La structure du tétramère de RuvA [119,121–124] présente une symétrie d'ordre 4 et deux faces différentes, l'une convexe, et l'autre concave.

2.2.2 Action sur les jonctions de Holliday

RuvA a une faible affinité pour l'ADN double brin et une meilleure affinité pour l'ADN simple brin [125], mais elle reconnaît surtout spécifiquement les jonctions de Holliday [126–128]. RuvA, sous forme tétramérique, peut charger une jonction de Holliday sur sa face concave [89,122,128,129] et lui imposer une conformation ouverte désempilée (symétrie d'ordre 4) (figure 2.2-a). RuvA est donc suspecté de faciliter l'échange des simples brins au cours de la migration [119,130]. Un ou deux tétramères de RuvA peuvent se fixer sur une jonction de Holliday (figure 2.2-b). Plus précisément, des complexes RuvA-HJ comportant seulement un tétramère de RuvA ont été observés [89,121,123,124,128,

131, 132], mais excepté pour le travail de Ingleston *et co.* [121], il s'agissait de conditions particulières : complexe en structure cristalline [123, 124] ou RuvA en quantité limitante par rapport à la jonction de Holliday [89, 128, 131, 132]. La forme à deux tétramères reste donc la plus probable. Il est à noter que l'affinité de RuvA pour les jonctions de Holliday est meilleure en l'absence de magnésium [133], sans doute en partie parce que dans ces conditions la jonction est déjà en conformation ouverte.

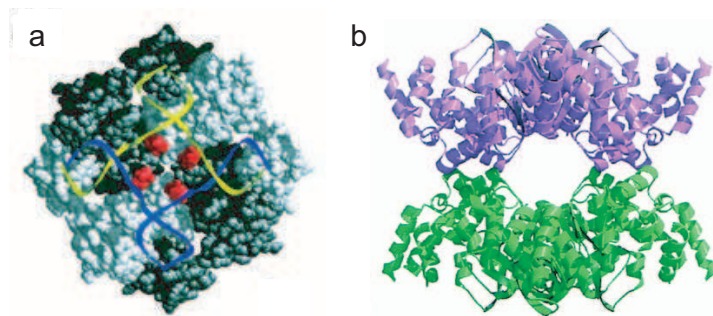


FIGURE 2.2 – Exemples de structures cristallographiques de RuvA sur la jonction de Holliday (images tirées de [121] et [122]). (A) La jonction de Holliday est en conformation ouverte, calée sur la surface concave du tétramère qui présente une symétrie d'ordre 4. La protéine recouvre 8 paires de bases sur chaque branche. En rouge sont représentés les 4 pointes acides du tétramère de RuvA qui sont très conservées et interviennent de façon importante dans l'interaction avec la jonction et dans la régulation de l'activité du complexe RuvABC [121, 134] (voir plus loin). (B) Au milieu du complexe assemblé en double tétramères, il existe un espace pouvant contenir une jonction de Holliday. Les deux tétramères de RuvA sont maintenus ensemble via des interactions spécifiques (voir plus loin).

2.3 RuvB

2.3.1 Description de RuvB

RuvB est une protéine de 37 kDa [108, 113, 135] qui s'assemble en hexamère autour de l'ADN double brin [101, 136–138] (figure 2.3) et qui présente une activité ATPase [125, 135, 139].

2.3.2 RuvB est une protéine de la famille AAA+

A l'origine identifiée comme une hélicase hexamérique ouvrant l'ADN dans le sens 5'→3' [138, 140, 141], RuvB n'est en fait pas capable d'ouvrir la double hélice sur de longues distances [141, 142]. D'ailleurs, elle ne contient pas certains des motifs essentiels qui déterminent la famille des ARN/ADN-hélicases [143]. Cette dernière comprend par exemple les protéines DnaB [144] et rho [145] de *E. coli*, gp4 du bactériophage T7 [146], gp41 du bactériophage T4 [147], E1 du *Papilloma virus* [148] ou encore LTag du virus *SV40* [149].

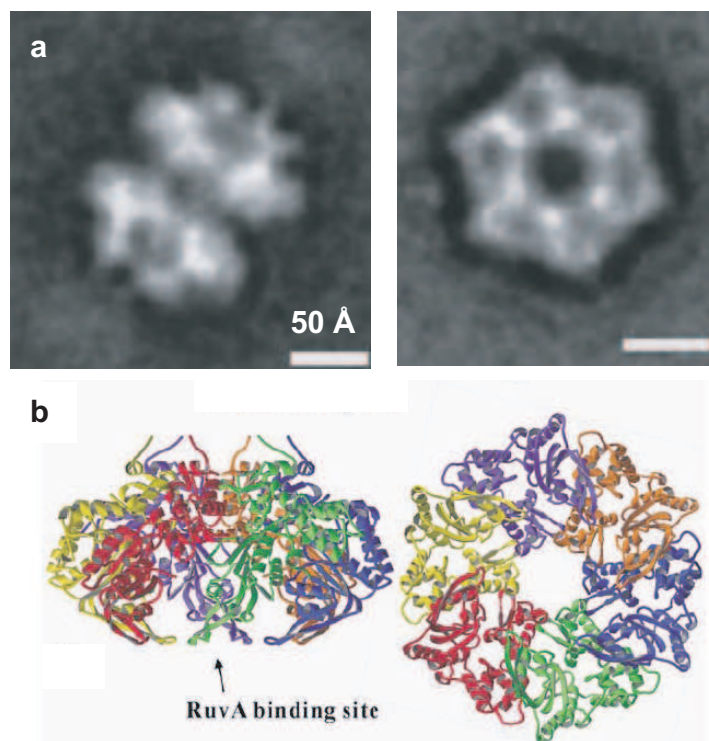


FIGURE 2.3 – Structures d’hexamères de RuvB. (a) Vue en microscopie électronique de doubles hexamères de RuvB formés en présence d’ATP γ S et entourant de l’ADN double brin (image moyenne issue de l’observation de plusieurs centaines de complexes) [101]. (b) Modèle atomique de la structure obtenue par reconstruction [136] (RuvB de *Thermus maritima*).

RuvB a finalement été classée, en raison de sa séquence [150], de sa structure [151], d’analyses biochimiques [142] ou d’analyses par mutations [152], dans la famille des protéines AAA+ («ATPases Associées à diverses Activités cellulaires»). Cette famille regroupe différentes classes de protéines telles que des chaperonnes, des protéases, des protéines agissant sur les acides nucléiques, ou encore ayant un rôle dans la formation ou la fusion des vésicules, dans la formation du faisceau mitotique ou dans l’intégrité du cytosquelette [150, 153]. Les membres de la famille AAA+ partagent certains motifs types (tels que les motifs Walker A et B, ou les motifs Sensor 1 et 2) impliqués dans la reconnaissance et l’hydrolyse des nucléotides, ainsi que dans la conversion de l’énergie chimique en changements conformationnels.

2.4 RuvAB

2.4.1 Action *via* RuvA sur les jonctions de Holliday

RuvB a une faible affinité pour les jonctions de Holliday et le rôle de RuvA est de recruter RuvB vers la jonction [126, 128, 133, 154, 155]. En fait RuvA et RuvB augmentent mutuellement leur affinité pour la jonction de Holliday et l’on observe qu’en

présence d'ADN, et encore plus en présence de jonctions de Holliday, RuvA stimule l'activité ATPase de RuvB [120, 125–127, 139, 154, 156, 157].

2.4.2 Migration des jonctions de Holliday : rôle moteur de RuvB et rôle structurel de RuvA

RuvB interagit avec RuvA pour faire migrer les jonctions de Holliday en hydrolysant de l'ATP [125, 126, 128, 139, 156]. RuvB est donc reconnue comme constituant le moteur du complexe RuvAB qui intervient dans la migration des jonctions de Holliday [127].

L'existence de ce complexe a été confirmée de plusieurs façons. Tout d'abord, bien que RuvB soit capable à elle seule de faire migrer la jonction [154, 156, 158], cette activité ne peut avoir lieu que dans des conditions particulières : absence de sel, haute concentration en protéines et parfaite homologie entre les brins d'ADN échangés. Il ne s'agit donc pas d'une activité compatible avec les conditions *in vivo*.

D'autre part, RuvA et RuvB peuvent s'assembler en présence d'ions divalents [157] et forment, en présence de nucléotides non-hydrolysables, un complexe spécifique et stable sur la jonction de Holliday [120, 126].

Enfin, il a été montré que RuvA est requise de façon continue au cours de la migration [158], confirmant l'idée que RuvA et RuvB agissent ensemble sous forme d'un complexe.

2.4.3 Structure du complexe RuvAB

Concernant la structure du complexe, des études par DNaseI footprinting [159] et des expériences de microscopie électronique [130, 160, 161] ont montré que RuvA et RuvB s'assemblent sur les jonctions de Holliday pour former un complexe où la jonction est prise en sandwich par deux tétramères de RuvA, et où deux hexamères de RuvB s'assemblent à leur tour sur deux brins opposés de la jonction, de part et d'autre de RuvA (figure 2.4). Néanmoins, dépendant de la concentration relative des protéines RuvA et RuvB, il a été observé des complexes de stœchiométries différentes, où RuvA chargée sur la jonction était encadrée par un, trois ou quatre hexamères de RuvB [161] (figure 2.5) ; ces formes de complexes sont présumées ne pas être des formes actives de la protéine.

2.4.4 Rôle actif de RuvA

La fonction de RuvA ne se limite pas à un rôle structurel en servant simplement à assurer le maintien en contact entre la jonction de Holliday et le moteur RuvB. Tout d'abord, concernant l'interaction de RuvA avec la jonction de Holliday, lorsque l'on compare les structures à un ou deux tétramères, celles-ci présentent une certaine diversité de conformations [129], notamment en ce qui concerne l'état des paires de bases au point de branchement, qui peuvent être soit appariées soit ouvertes selon les cas [123, 124]. Ces différences de conformation suggèrent l'existence d'une dynamique dans l'interaction entre les tétramères de RuvA et la jonction.

Par ailleurs, on sait que RuvA influe sur l'activité migratoire de RuvB ainsi que sur l'activité endonucléase de RuvC (voir section suivante) [105, 121]. Cette modulation

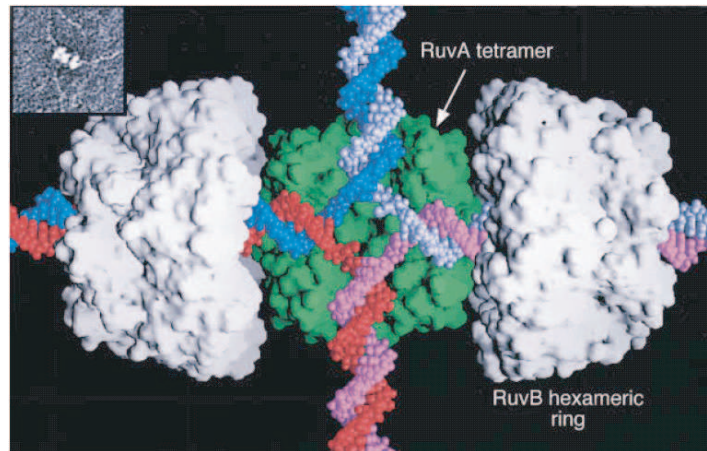


FIGURE 2.4 – Structure du complexe RuvAB modélisée à partir des structures obtenues en microscopie électronique [162]. Ici, un seul tétramère de RuvA a été représenté fixé sur la jonction. Encart : image en microscopie électronique d'un complexe RuvAB chargé sur une jonction de Holliday (voir aussi figure 2.5).

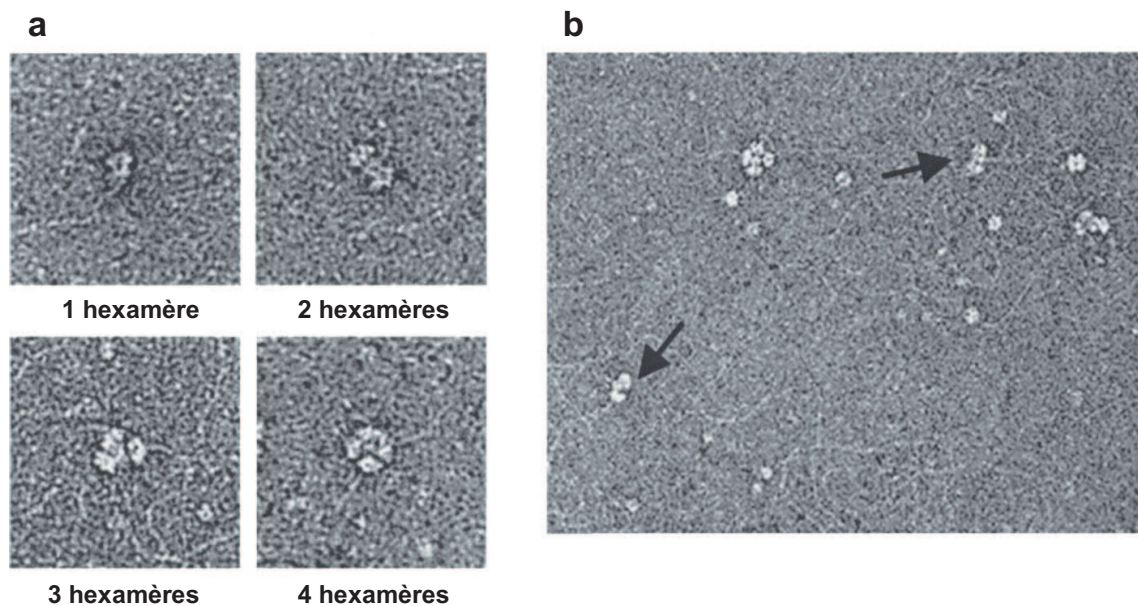


FIGURE 2.5 – Microscopie électronique de complexes RuvAB chargés sur des jonctions de Holliday (image tirée de [161]). (a) Effet de la concentration relative de RuvA et RuvB sur la stœchiométrie des complexes RuvAB formés. Lorsque l'on augmente le rapport des concentrations RuvB/RuvA, on augmente le nombre moyen d'hexamères de RuvB chargés sur chaque jonction. (b) Champ de vue plus large, montrant deux complexes contenant chacun deux hexamères de RuvB (flèches). C'est la stœchiométrie présumée pour un complexe actif pour la migration.

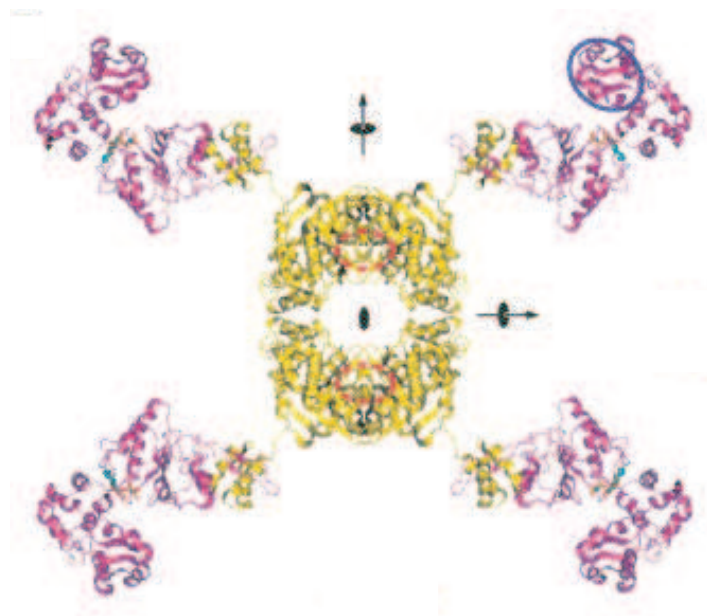


FIGURE 2.6 – *Structure cristallographique représentant deux tétramères de RuvA où quatre des sous-unités interagissent spécifiquement avec le Domaine I d'un monomère de RuvB [163].*

se fait tout d'abord directement à travers le domaine de la protéine RuvA en contact avec RuvB [164] (voir figure 2.6), mais aussi de façon plus indirecte, à travers les 4 pointes acides du tétramère [121, 134] (figure 2.2). Étonnamment, des mutations au niveau de ces pointes peuvent entraîner par exemple une accélération de la migration [121].

Tous ces résultats démontrent que RuvA a un rôle structurel actif au cours de la migration, et confirment ainsi que c'est le complexe RuvAB, et non la protéine RuvB seule, qui constitue la forme active naturelle.

2.4.5 Activité migratoire de RuvAB

Propriétés générales

Le sens de migration de la jonction est déterminé par la position des hexamères qui déplacent la jonction en tirant chacun le double brin d'ADN qu'il entoure hors du tétramère de RuvA [159, 161, 165] (voir figure 2.4).

Par ailleurs, RuvAB est capable de dissocier le filament RecA [166] après que celui-ci ait initié la recombinaison à partir d'une région simple brin.

Migration à travers les hétérologies et les lésions UV

Concernant la migration en présence d'hétérologies de séquences, il a été montré récemment sur des expériences en molécule unique [167] qu'une hétérologie de 20 paires de bases est un obstacle important à la migration de la jonction par RuvAB. De plus, la migration semble devoir démarrer dans une zone d'homologie [127].

En revanche, le franchissement d'hétérologie est considérablement facilité par la présence de SSB (Single-Strand Binding proteins¹) qui autorisent le franchissement de 1.8 kb d'hétérologie de séquence [168]. Par ailleurs sur des expériences de recombinaison à trois brins (un ADN simple brin et un ADN double brin) [169,170] ou à 4 brins avec un des ADN portant une insertion [171], RuvAB et RecA peuvent agir ensemble pour faciliter le franchissement de l'hétérologie.

Par ailleurs, RuvAB est capable de faire migrer la jonction de Holliday à travers des lésions d'ADN causées par les UV [156].

2.5 RuvC

2.5.1 Description de RuvC et action sur les jonctions de Holliday

RuvC est une endonucléase de 19 kDa [100,110] qui résout les jonctions de Holliday [95,172–176] en coupant de façon symétrique deux simples brins de même orientation près du point de branchement [177] (figure 2.7). La protéine est active sous forme de dimère [173,175] et en présence d'ions magnésium [178,179]. La résolution se fait de façon dépendante à la séquence [178,180] et ne nécessite que 2 paires de bases d'homologie au niveau du point de branchement [179,181]. RuvC coupe le simple brin au niveau du site consensus 5'-(A/T)TT↓(G/C)-3' [177,179,181,182], en 3' d'un groupe phosphate [173]. Les brins coupés peuvent ensuite être reconnectés par une DNA-ligase [175,178].

En l'absence d'ions divalents, RuvC forme un complexe spécifique avec la jonction de Holliday qui est alors contrainte dans une conformation de symétrie d'ordre 2, différente à la fois de la conformation ouverte et de la conformation empilée [183]. Cette structure fait apparaître une rupture des paires de bases au niveau du point de branchement [178,179,184,185]. Le fait de pouvoir découpler la reconnaissance de la jonction de sa résolution en changeant les conditions ioniques suggère que la formation du complexe et la résolution de la jonction font appel à des mécanismes différents [186].

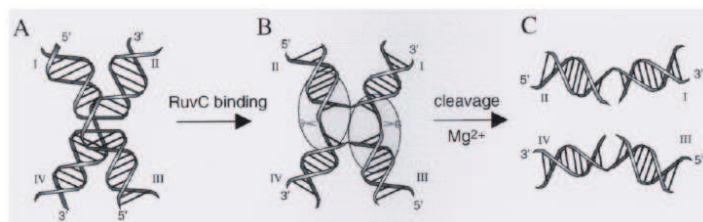


FIGURE 2.7 – *Modèle pour la résolution de RuvC. (A) RuvC reconnaît spécifiquement la jonction de Holliday, représentée ici en conformation empilée. (B) Elle se fixe sur la jonction indépendamment des conditions ioniques, et impose une symétrie d'ordre 2 qui défait des paires de bases au niveau du point de branchement. (C) En présence de magnésium, la jonction est résolue et les deux simples brins qui étaient continus en (A) sont coupés de manière symétrique [187].*

¹protéines se liant au simple brin (d'ADN)

2.5.2 Coordination avec RuvAB

Des études montrent que l'activité de RuvC est modulée par RuvAB. Tout d'abord, la spécificité de séquence de RuvC et son inhibition par RecA suggèrent que son activité est couplée à une activité de migration de la jonction, migration nécessaire pour amener le complexe au niveau des séquences consensus [180,182,188]. Cette idée est renforcée par le fait qu'en présence de RuvAB, l'efficacité de résolution de RuvC est améliorée, sans pour autant changer la séquence consensus [166,189,190]. Il a en outre été proposé que dans le complexe RuvABC, la reconnaissance par RuvC de la séquence consensus induit le détachement de RuvA pour que la jonction puisse se mettre en conformation adéquate (symétrie d'ordre deux - voir ci-dessus) pour le clivage par RuvC [132].

Par ailleurs, *in vivo*, des souches de bactéries mutées dans les gènes *ruv* présentent des phénotypes identiques indépendamment du gène muté [95]. De plus, une surexpression de RuvA entraîne une sensibilité extrême aux UV [99]; cet effet est potentiellement dû à une inhibition de l'activité endonucléase de RuvC par le fait que la jonction de Holliday, constamment prise en sandwich entre deux tétramères de RuvA, est alors rendue inaccessible à RuvC [132].

D'autre part, *in vitro*, il a été l'existence de complexes RuvBC [166,191], RuvAC [132,134] ou RuvABC [192] fonctionnels et pouvant s'assembler sur la jonction de Holliday. De plus, des mutations dans RuvA modulent l'activité endonucléase de RuvC [121], et le sens de résolution de la jonction est modulé par l'assemblage de RuvAB sur la jonction [161,166].

Enfin, des études utilisant à la fois des protéines Ruv de chez *E. coli* et des homologues d'autres organismes, comme par exemple RuvA de *Mycobacterium leprae* [104] ou *Mycoplasma pneumoniae* [105] avec RuvBC de chez *E. coli*, ont mis en évidence, via l'incompatibilité de ces complexes hétérologues, la nécessité d'interactions spécifiques pour le bon fonctionnement de RuvABC [104,105].

Ces résultats indiquent donc l'existence d'un complexe RuvABC actif à la fois pour la migration et pour la résolution des jonctions de Holliday, dans lequel l'action du moteur RuvB fait migrer la jonction pendant que RuvC examine la séquence [151,193] (figure 2.8).

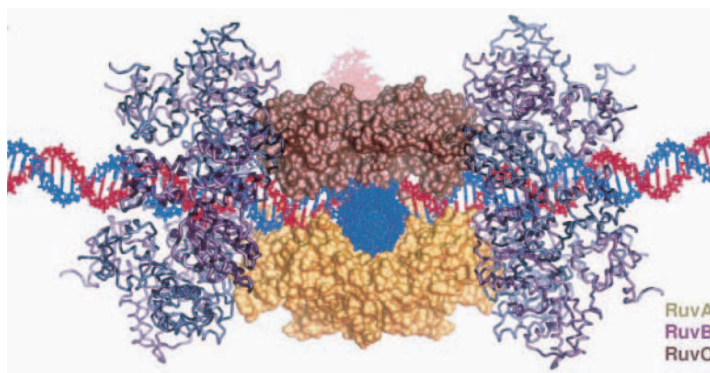


FIGURE 2.8 – Modèle illustrant la structure probable d'un complexe RuvABC [151]. Le complexe est vu dans le plan de la jonction. Un tétramère de RuvA (en jaune) et un dimère de RuvC (en rouge) sont assemblés sur chacune des faces de la jonction. De part et d'autre, deux hexamères de RuvB (en bleu) entourent l'ADN double brin.

2.6 Fonctionnement du moteur RuvAB(C)

Une des questions qui peuvent se poser dans le cas d'un complexe tel que RuvAB est de savoir comment celui-ci fonctionne, et en particulier par quel mécanisme l'hydrolyse des nucléotides, les changements de conformation du complexe et l'échange des simples brins peuvent être couplés. Comme nous allons le voir, les structures cristallographiques, les caractéristiques de l'activité du complexe ainsi que l'étude de mutants permettent de répondre partiellement à cette question.

2.6.1 Structure et interaction des sous-unités RuvA et RuvB

Les études cristallographiques de RuvA montrent que la protéine, sous forme de monomère, est constituée de trois domaines [119]. Les domaines I et II forment le cœur du tétramère, et sont impliqués dans la reconnaissance de la jonction de Holliday [122–124]. Le domaine III est impliqué dans l'interaction avec RuvB [131, 164].

Les structures cristallographiques de monomères de RuvB ont permis d'identifier trois domaines dans la sous-unité [103, 151] (figure 2.9). Les deux premiers domaines (Domaine I ou "N-terminal" et domaine II ou "M") contiennent des motifs Walker A et B (motifs hélicase I et II) ainsi que des motifs Sensor 1 et 2, qui caractérisent les membres de la famille AAA+ et sont impliqués dans la reconnaissance et l'hydrolyse des nucléotides, la reconnaissance de l'ADN et les changements de conformation [150]. Par ailleurs, le domaine I est également impliqué dans l'interaction avec RuvA [163]. Le troisième domaine (Domaine III ou "C-terminal") est similaire au motif "winged-helix" impliqué dans le contact avec l'ADN.

La mutation de résidus à l'interface entre RuvA et RuvB provoquent des déficiences dans l'activité migratoire du complexe RuvAB [131, 194] montrant que l'interaction RuvA-RuvB est essentielle pour le bon fonctionnement (activité ATPase et activité migratoire) du complexe. En outre, il apparaît que l'interaction entre RuvA et l'une des sous-unités de l'hexamère de RuvB impose une déformation importante de l'anneau [163], suggérant que cette interaction joue un rôle dans la régulation du fonctionnement de l'hexamère.

Enfin, les différentes structures obtenues révèlent une grande flexibilité dans les positions relatives des domaines et des sous-unités [122, 129, 131, 160, 163, 164], soulignant l'importance des changements de conformation dans le fonctionnement du complexe.

2.6.2 Activité ATPase et effet des mutations

Une première étude de l'activité ATPase de RuvB a été réalisée par l'équipe de S.C. West [137]. Puis des études plus exhaustives, en présence [195] ou en l'absence [196] de RuvA, ont été menées par l'équipe de Michael M. Cox. Ces études ont mis en évidence la complexité de l'activité ATPase de la protéine.

L'hydrolyse de l'ATP dépend en effet de la concentration en protéines, de la concentration en ATP (qui peut avoir un rôle inhibiteur au delà de 2mM), de la présence ou non de RuvA et du substrat utilisé (ADN simple brin, double brin, linéaire ou circulaire). De plus l'activité ATPase de RuvB seule en présence d'ADN double brin linéaire s'arrête au bout de quelques dizaines de cycles par unités si une concentration en ATP inférieure au K_M (constante de Michaelis-Menten) est utilisée.

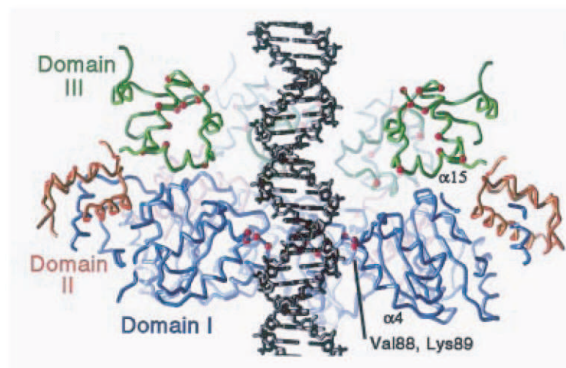


FIGURE 2.9 – Vue partielle des domaines de RuvB et de leurs positions éventuelles dans un hexamère de RuvB entourant un double brin d'ADN (image tirée de [151]). L'interaction avec RuvA, qui n'est pas représentée ici, se fait via le domaine I (en bleu). Le site de fixation de l'ATP est formé par les domaines I et II, et se trouve à l'interface entre deux sous-unités. La fixation de l'ATP est couplée à un mouvement du Domaine III qui vient alors entrer en contact avec l'ADN [151, 163].

Ces études ont également révélé une brisure de symétrie dans l'anneau hexamérique de RuvB puisqu'il semble que les molécules d'ATP sont hydrolysées par groupe de 2. D'autre part, la nette augmentation de l'activité ATPase en présence d'ADN circulaire suggère que les hexamères de RuvB sont capables de se déplacer le long de l'ADN.

Certains mutants de RuvB ont été isolés et étudiés vis-à-vis de leurs effets *in vivo* ou vis-à-vis de leurs propriétés biochimiques *in vitro*. La caractérisation de ces mutants (éventuellement en association avec la protéine sauvage ou avec une autre protéine mutée (hétérohexamères)) permet de mettre en évidence des propriétés importantes pour comprendre le fonctionnement de RuvB. Plus précisément, les mutations suivantes ont été étudiées : des mutations dans le motif Walker A sur les résidus K68 ou T69 [197, 198], des mutations entre les motifs Sensor 1 et Sensor 2 (résidu R174 proche du γ -phosphate du nucléotide) [199], des mutations double K68A-R174A [199], des mutations dans le motif Walker B (résidu D113) [200, 201], des mutations dans le motif "winged-helix" (résidu R318) [152], et enfin des mutations du résidu L268 (dans le domaine III) [202].

Ces études ont par exemple permis de montrer que la protéine RuvB^{D113E} est capable de former des hexamères et de catalyser, en association avec RuvA, la migration des jonctions de Holliday. Cependant, ses activités ATPase ou hélicase se trouvent réduites. Ces résultats peuvent suggérer des modèles de fonctionnement [201].

Par ailleurs, les homohexamères de RuvB^{K68A}, RuvB^{R134A} ou RuvB^{K68A-R174A} sont déficients en activité ATPase, mais en revanche l'activité ATPase est restaurée chez les hétérohexamères formés par RuvB^{K68A} et RuvB^{R134A} en proportions 1 :1, mais pas l'activité migratoire [199]. Il ressort de ces études que le site catalytique des nucléotides est formé par l'assemblage de deux sous-unités de RuvB et se trouve donc à l'interface entre ces deux sous-unités. Dans ce site catalytique, l'une des sous-unités joue un rôle allostérique permettant de stimuler l'hydrolyse du nucléotide par la sous-unité adjacente [199].

Enfin, il a été montré que les cellules qui expriment RuvB^{L268S} sont très sensibles aux UV, alors qu'*in vitro*, et en présence de RuvA et de RuvC, la protéine RuvB^{L268S} est totalement active en ce qui concerne l'activité migratoire ou le clivage [202]. Ce résultat suggère que RuvB est susceptible de jouer *in vivo* d'autres rôles encore méconnus.

2.7 Questions en suspens

Comme nous venons de le voir, le fonctionnement de RuvABC est complexe. Tout d'abord il s'agit d'une protéine qui peut contenir jusqu'à 20 sous-unités (2 hexamères de RuvB + 2 tétramères de RuvA). Par ailleurs, les études de ses activités ATPase, migratoire, ou de résolution (avec RuvC), dressent un tableau d'interactions multiples, à la fois entre les sous-unités elles-mêmes, mais aussi avec leur substrat : l'ADN et la jonction de Holliday. Dès lors, même si l'on peut commencer à tracer les contours des mécanismes possibles de son fonctionnement, il subsiste encore de nombreuses questions .

2.7.1 Quel modèle de cycle catalytique ?

Du fait de l'assemblage de RuvB en anneaux hexamériques, plusieurs modèles types de cycles catalytiques peuvent déjà être distingués. Tout d'abord l'anneau hexamérique peut soit tourner suivant l'axe de l'ADN pendant la catalyse, soit garder une orientation fixe tout au long du fonctionnement du moteur. Les études qui mettent en évidence l'importance et la spécificité de l'interaction entre RuvA et RuvB à travers le domaine III de RuvA et le domaine I de RuvB [163] argumentent plutôt en faveur du second cas.

Par ailleurs, la symétrie hexamérique suggère que l'hydrolyse de l'ATP puisse se faire dans plusieurs des sous-unités de l'hexamère, avec une symétrie d'ordre 6, 3 ou 2 dans la position de ces sous-unités. En particulier, il ressort des études de l'activité ATPase [137, 195, 196] ainsi que des études des hétérohexamères [199] que toutes les sous-unités ne sont pas équivalentes dans l'anneau de RuvB et qu'elles n'ont pas toutes besoin d'être compétentes dans l'hydrolyse pour que l'activité migratoire du complexe soit conservée [199]. Ce résultat permet donc d'écarter l'hypothèse de la symétrie d'ordre 6.

De plus, les sous-unités qui ont une activité ATPase peuvent soit fonctionner de concert, soit en alternance avec un déphasage en accord avec la symétrie imposée (par exemple, il pourrait y avoir 3 sous-unités qui effectueraient l'hydrolyse de l'ATP à tour de rôle mais en déphasage les uns par rapport aux autres).

Ces arguments sur la symétrie doivent toutefois être relativisés. Tout d'abord, l'interaction spécifique de l'hexamère avec RuvA (entre un monomère de l'anneau de RuvB et un monomère du tétramère de RuvA) peut éventuellement être une source de brisure de symétrie au sein de l'hexamère. De même, l'interaction des monomères de RuvB avec l'ADN peut aussi être un élément de contrainte à prendre en compte ; en effet, à moins qu'il ne se trouve déformé par l'anneau hexamérique, l'ADN ne présente pas de symétrie de rotation.

D'autres arguments peuvent encore être évoqués. Par exemple, le fait que RuvB forme des dimères en solution suggère un découpage de l'hexamère en trois dimères, découpage corroboré par les effets allostériques entre sous-unités adjacentes. D'une autre

manière, les études de l'activité ATPase indiquent que l'hydrolyse des nucléotides pourrait se faire deux par deux, suggérant donc une symétrie d'ordre 2 dans l'hexamère.

De ces divers arguments, plusieurs modèles de cycles catalytiques ont été proposés [151,195,199], dont l'un est représenté figure 2.10. Néanmoins, les informations disponibles sont encore insuffisantes pour permettre de trancher entre les différents modèles possibles.

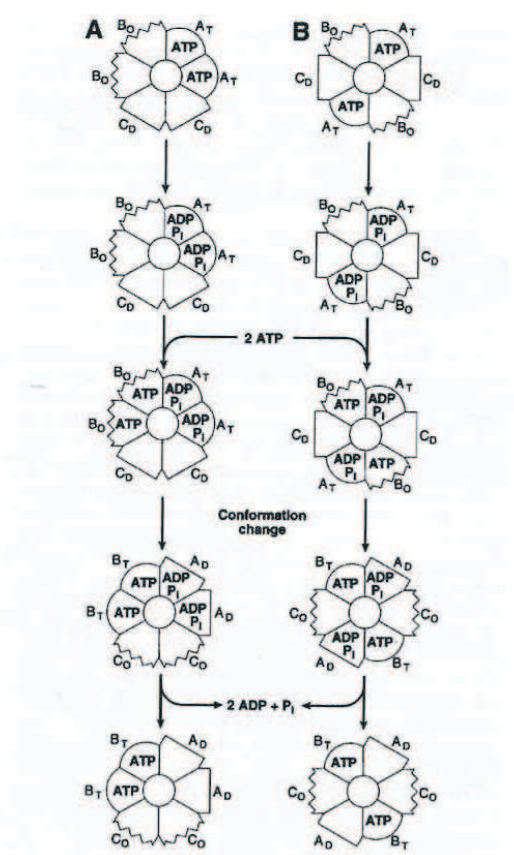


FIGURE 2.10 – Exemples de cycles catalytiques possibles pour l'hexamère de RuvB (tiré de [195]). Dans cet exemple, où deux ATP sont hydrolysés en même temps, l'hydrolyse peut avoir lieu soit dans deux sites catalytiques adjacents, induisant une symétrie d'ordre 3 pour le cycle, soit dans deux sites opposés (symétrie d'ordre 6 en cas de permutation des sites catalytiques actifs, ou d'ordre 2 (non représenté) si les deux sous-unités actives sont toujours les mêmes). On peut également imaginer par exemple un autre cycle à symétrie d'ordre 3, où la catalyse de l'ATP se passerait toujours dans les trois mêmes sous-unités à 60° l'une de l'autre.

2.7.2 Un complexe RuvABC ?

L'existence d'un complexe RuvABC fonctionnel *in vivo* semble être très probable. Néanmoins, la plupart des études montrent que RuvA s'assemble en double tétramère sur la jonction (voir plus haut), et il existe une compétition entre RuvA et RuvC pour

se charger sur le point de branchement [132, 134]. La question subsiste donc de savoir comment le complexe RuvABC se forme. Y a-t-il par exemple un équilibre dynamique entre deux structures différentes du complexe, l'une avec RuvC et l'autre sans ? Ou bien ces deux structures se forment-elles aléatoirement dans des proportions dépendantes des concentrations respectives des protéines Ruv ? Rappelons que chez *E. coli* (mais cette situation peut varier selon les organismes) l'expression de RuvA et RuvB est modulée par la réponse SOS, mais pas celle de RuvC ; cette différence de régulation, entre RuvA et RuvB d'une part et RuvC d'autre part, est certainement pour la cellule un moyen de régulation entre l'activité de résolution et l'activité de migration. Cette régulation pourrait être importante pour contrôler la quantité d'information génétique à échanger selon les besoins.

2.7.3 Relation entre l'hydrolyse et la migration

Bien qu'extrêmement poussées, les études de l'activité ATPase de RuvB et RuvAB faites par P.A. Marrione et M.M. Cox [195, 196] ne permettent pas de comprendre le fonctionnement du complexe, notamment en raison du fait que le substrat utilisé n'était jamais la jonction de Holliday mais toujours de l'ADN linéaire ou circulaire, ce qui pose la question de la spécificité de l'activité ATPase étudiée. Cette question se pose d'autant plus qu'ils ont déterminé pour cette activité une stoechiométrie optimum de 4 RuvA et 2 RuvB en présence d'ADN en excès [120], stoechiométrie assez différente de celle attendue pour un complexe RuvAB fonctionnel pour la migration (4 ou 8 RuvA et 12 RuvB). Par ailleurs, les études de P.A. Marrione et M.M. Cox ont été faites à des concentrations importantes de protéines ($>1 \mu\text{M}$ pour chaque protéine), soulevant une fois encore la question de la spécificité de l'activité mesurée.

2.7.4 Action coordonnée des sous-unités du complexe

Un autre problème soulevé, en relation avec la relative grande taille du complexe et avec le fait qu'il contient a priori deux hexamères actifs pour l'activité migratoire, est la question de la synchronisation entre les deux hexamères. Ceux-ci sont en effet séparés par la protéine RuvA, et l'absence de synchronisation ou de coordination entre les deux hexamères paraît peu probable au vu de la perte d'efficacité qu'une telle situation entraînerait. De plus, la structure de la jonction de Holliday implique que l'activité d'un hexamère de RuvB chargé sur l'un des bras de la jonction puisse être ressentie par l'autre hexamère. L'information nécessaire à la synchronisation peut donc passer soit directement via l'ADN, soit par l'intermédiaire de RuvA. Cette dernière possibilité est supportée par le fait que des mutations dans RuvA au niveau de résidus impliqués dans l'interaction avec RuvB inhibent l'activité migratoire du complexe [164].

En allant plus loin, on peut poser la question de savoir si les deux hexamères fonctionnent simultanément (hydrolyse et couplage au déplacement de l'ADN se faisant de manière "concertée" entre les deux hexamères) ou alternativement (les hexamères effectuant la catalyse l'un après l'autre). Cette question est notamment importante pour la relation entre fréquence de l'hydrolyse et vitesse de migration, la vitesse de migration étant, à vitesse d'hydrolyse constante, deux fois plus rapide dans le second cas que dans le premier. Un raisonnement en vitesse irait en faveur du second mécanisme ; toutefois, il faut aussi tenir compte du fait qu'un mécanisme concerté permet au moteur de développer une puissance plus importante pour lutter contre d'éventuels obstacles à la migration.

2.7.5 Le pas de la migration

Un autre aspect essentiel à la description du fonctionnement du complexe RuvAB est la détermination du pas élémentaire que celui-ci induit au cours du processus de migration dirigé. Du fait de la symétrie hexagonale du complexe, on peut s'attendre à une fraction 1, 2, 3 ou 6 de tour d'hélice d'ADN, ou à un multiple entier de paires de bases (si l'on suppose que RuvB est plus sensible à la périodicité du squelette phosphate).

Cette information sur le pas de la migration, ajoutée à l'information de la forme prise par l'ADN au sein de l'hexamère de RuvB (l'ADN pouvant éventuellement être déformé par rapport à sa conformation B standard), imposeraient des restrictions sévères sur le mécanisme de fonctionnement du complexe et fourniraient des indices quant à la symétrie (ou la périodicité) du cycle catalytique.

2.7.6 Dynamique de la migration

Une autre caractéristique importante du moteur moléculaire que constitue RuvAB est la cinétique de son activité, c'est-à-dire la vitesse et la processivité avec lesquelles il est capable de déplacer la jonction de Holliday, et donc d'échanger l'information génétique entre deux molécules d'ADN. Seule une estimation de cette cinétique a été obtenue par Tsaneva *et al.* [156] : $10 \sim 20$ bp/s.

Il serait également intéressant d'étudier l'effet de la présence d'hétérologies de séquence ou encore l'effet de contraintes mécaniques sur les caractéristiques cinétiques du moteur. La quantification de ces effets contribue pour beaucoup à la compréhension du fonctionnement du moteur.

Deuxième partie

Montage expérimental

Chapitre 3

La Pince Magnétique

Cette partie décrit le montage expérimental utilisé pour toutes les expériences exposées dans ce manuscrit. La conception, la construction et la mise au point de ce montage ont constitué une part importante de ce travail de thèse.

3.1 Principe de fonctionnement d'une pince magnétique

En accrochant spécifiquement une molécule d'ADN par ses extrémités entre une surface de verre et une microbille paramagnétique, il devient possible de manipuler mécaniquement cette molécule en agissant sur la bille au moyen d'un champ magnétique produit par des aimants (Figure 3.1).

L'ADN étant invisible au microscope, seules les billes sont observables. On utilise alors un système de visualisation et un algorithme d'analyse d'image pour mesurer la position de la bille et ses déplacements dans les trois directions de l'espace. D'autre part, comme on le verra plus loin, l'analyse du mouvement brownien de la bille permet de déterminer la force de traction exercée sur la molécule.

La mesure de la hauteur de la bille par rapport à la surface de verre, traduit la valeur de l'extension de la molécule d'ADN. Si un processus biologique a pour effet de faire varier l'extension de la molécule d'ADN, il est alors possible d'étudier le cours de ce processus en temps réel.

3.2 Description du montage

3.2.1 Architecture du montage

Construire un montage expérimental de A à Z offre l'avantage de laisser un maximum de liberté pour sa réalisation. Mais cela impose aussi, avant même de placer la première pièce, d'avoir réfléchi à la fois à la structure globale de l'appareil, et aux détails des différents éléments qui vont le composer. Ces derniers doivent s'agencer entre eux dans la structure globale (qui devra alors éventuellement être modifiée par rapport au plan de départ). Enfin, il faut aussi prévoir une place pour les éventuelles améliorations futures. Ce n'est qu'au terme d'une lente maturation et de nombreux tâtonnements que l'on parvient à faire les choix qui détermineront l'architecture final du montage.

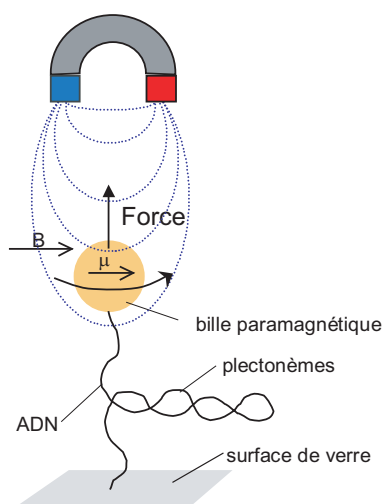


FIGURE 3.1 – *Principe de la pince magnétique. En ancrant une molécule d'ADN par ses extrémités entre une surface de verre et une bille paramagnétique, il devient possible de manipuler mécaniquement cette molécule individuelle. Un gradient de champ magnétique (B) oriente la polarisation μ de la bille et crée un gradient d'énergie potentielle qui produit une force de traction F sur la bille. La force de traction peut alors être modulée en éloignant ou en rapprochant les aimants. De plus en tournant les aimants, et donc le champ magnétique B , la bille est entraînée en rotation permettant ainsi de tordre la molécule d'ADN. Il peut alors apparaître des boucles dans la molécule (plectonèmes).*

Le premier souci a été de réduire au maximum les éventuelles sources de bruit, en particulier les vibrations et les dérives mécaniques. Le montage a donc été installé sur une table d'optique spécialement conçue pour absorber les vibrations. Par ailleurs, d'un montage de microscope commercial on n'a conservé que l'objectif, tout le reste (armature, éclairage, visualisation, porte-échantillon,...) a été "fait maison" et optimisé pour nos besoins. Pour réduire au minimum les jeux et dérives mécaniques entre les principales parties du montage (éclairage, aimants, échantillon, optique et caméra), on a conçu une architecture où ces dernières sont alignées selon un axe vertical et reliées entre elles par une structure qui conserve au maximum une symétrie cylindrique pour plus de robustesse (Figure 3.2).

3.2.2 Les différents éléments de l'appareil

Le microscope et la caméra

Dans la configuration que nous utilisons, en microscope inversé (échantillon éclairé par le dessus et observé en transmission par le dessous), l'axe optique s'étend au dessus et en dessous de l'échantillon. Ce dernier est donc disposé sur un plateau surélevé par rapport à la surface de la table d'optique (Figure 3.2).

Une ouverture à travers le plateau permet de faire traverser un tube qui renferme le trajet optique et qui relie l'objectif de microscope à la caméra CCD. L'image de l'échantillon est d'abord envoyé à l'infini à la sortie de l'objectif, puis une lentille de tube, traitée en surface afin d'éviter les réflexions internes, projette l'image sur le capteur

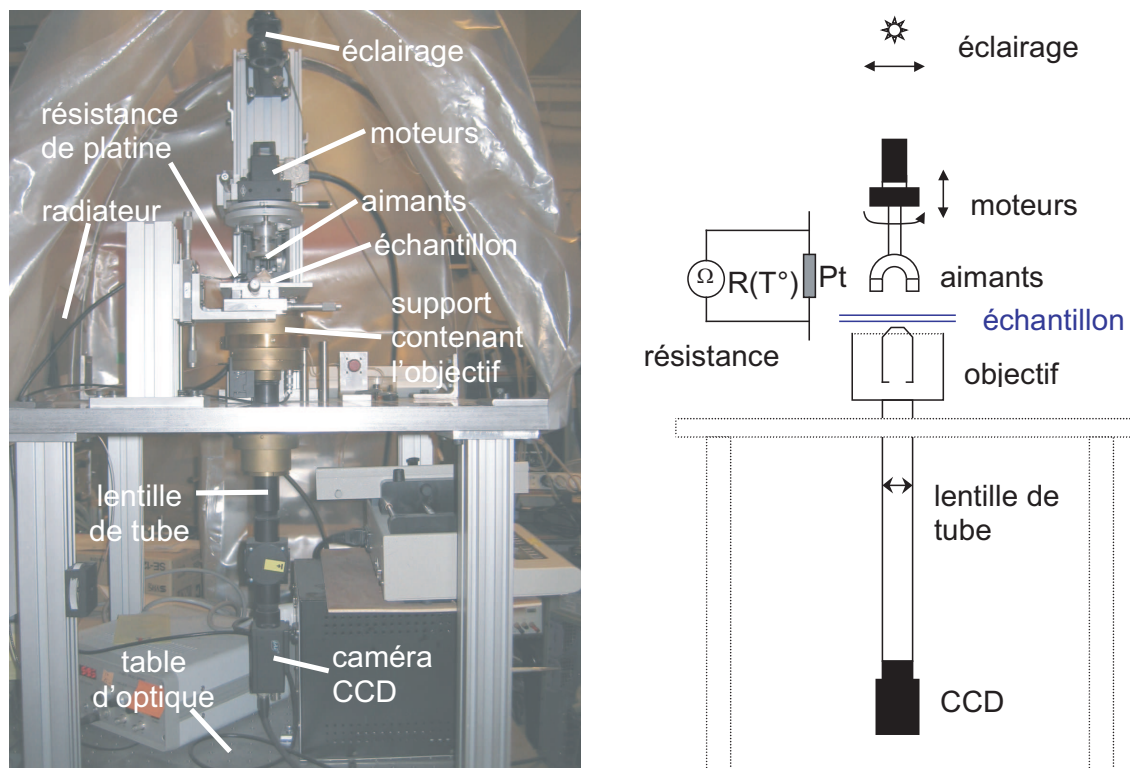


FIGURE 3.2 – Vue d'ensemble du montage.

de la caméra. Un cube (non représenté sur la figure 3.2) est intercalé au milieu du tube et permet d'insérer sur le trajet optique une lentille de Bertrand. Celle-ci est utilisée le cas échéant lorsque l'on souhaite décaler le plan focal ou élargir le champ de vue.

L'objectif utilisé est un modèle Leica C-plan 100x à huile et d'ouverture numérique $NA=1.25$. La caméra CCD est un modèle CV-M30 de chez JAI et elle est contrôlée à l'aide d'une carte d'acquisition PC-Vision de chez Coreco Imaging.

L'échantillon et le système microfluidique

L'échantillon consiste en un capillaire de verre de section interne $0.1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$. La faible épaisseur du capillaire permet d'approcher les aimants au plus près afin de pouvoir monter au maximum la force de traction exercée sur les billes.

A l'aide de tuyaux, on connecte les extrémités du capillaire, d'un côté à un petit réservoir qui fait puits d'entrée, et de l'autre à une seringue (Figure 3.4). Dans le puits d'entrée sont déposées les solutions (contenant éventuellement l'ADN, les billes ou les protéines) qui doivent être acheminées jusque dans le capillaire. Une pompe permet alors d'actionner la seringue pour aspirer doucement ces solutions et les amener jusque dans le capillaire.

Une des difficultés de ce dispositif a été d'empêcher l'apparition de bulles d'air au niveau des différentes connexions du système. Un colmatage des connexions a tout d'abord été essayé, mais cette technique s'est révélée peu efficace. La solution trouvée consiste à faire en sorte qu'au niveau d'une connexion, l'orifice de la nouvelle section plonge entièrement dans celle de l'ancienne (Figure 3.5). Les connexions sont alors toutes

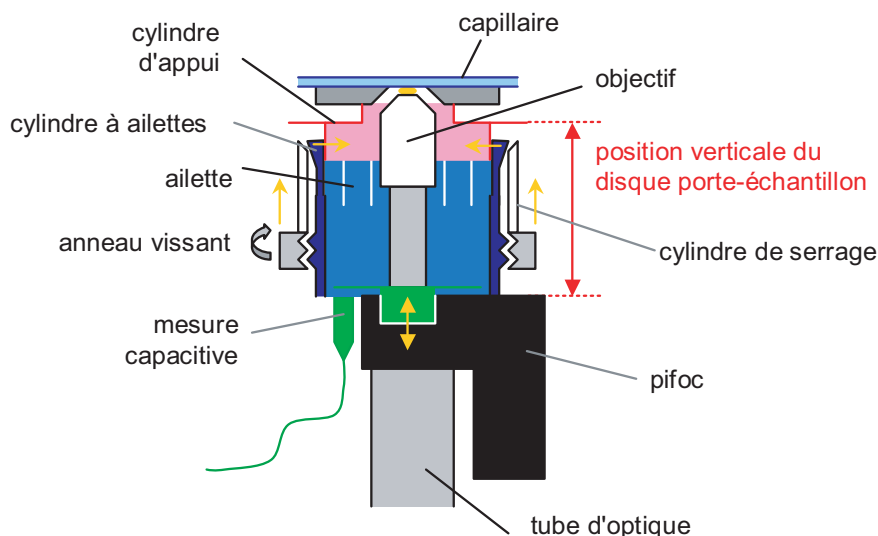


FIGURE 3.3 – Schéma en coupe du porte-échantillon. Le terme PIFOC désigne un système commercial de déplacement d'objectif de microscope via une cale piézoélectrique. La base du PIFOC, le tube d'optique ainsi que le cylindre à ailettes sont solidaires. La hauteur de l'objectif de microscope est ajustée grâce au PIFOC et contrôlé par une mesure capacitive (groupe vert). La position verticale grossière de l'échantillon au dessus de l'objectif est ajustée au moyen du disque porte-échantillon qui peut être déplacé verticalement (groupe rouge). Une fois sa hauteur réglée, le disque porte-échantillon est immobilisé au moyen du serrage de l'anneau vissant qui, en faisant remonter le cylindre de serrage, appuie contre les ailettes du cylindre à ailettes qui bloquent alors par serrage le disque porte-échantillon.

de type femelle-mâle, et en entrant dans le capillaire, le fluide s'écoule toujours de la section large vers la section étroite. Dans cette configuration, l'air ne peut plus pénétrer dans le système car pour ce faire il devrait remonter le sens d'écoulement du fluide.

Le porte-échantillon

C'est un des éléments importants du montage car son rôle est multiple (Figure 3.3). Il doit permettre de positionner verticalement l'échantillon de façon stable et précise au dessus de l'objectif, il doit être conçu de façon à pouvoir déplacer finement le capillaire au dessus de l'objectif lors de la recherche de molécules d'intérêt, et ceci tout en assurant la stabilité du positionnement une fois celui-ci arrêté. Pour garantir cette stabilité vis-à-vis des dérives mécaniques, il faut réussir, une fois la molécule trouvée, à assurer une parfaite solidarité entre le capillaire et l'objectif. Le porte-échantillon devra donc également incorporer l'objectif.

L'idée est de fixer le capillaire sur un plateau et que celui-ci vienne s'appuyer sur un cylindre qui entoure l'objectif et qui soit solidaire de celui-ci. Le plateau est déplacé à l'aide d'une platine x-y-z, mais connecté à celle-ci par des ressorts (Figure 3.4-a). Le plateau est ainsi stabilisé en position sur le cylindre (et donc aussi par rapport à l'objectif) simplement par les forces de frictions. Ces dernières sont ajustables en jouant sur l'axe z de la platine x-y-z pour appuyer plus ou moins le plateau sur le cylindre. Les ressorts

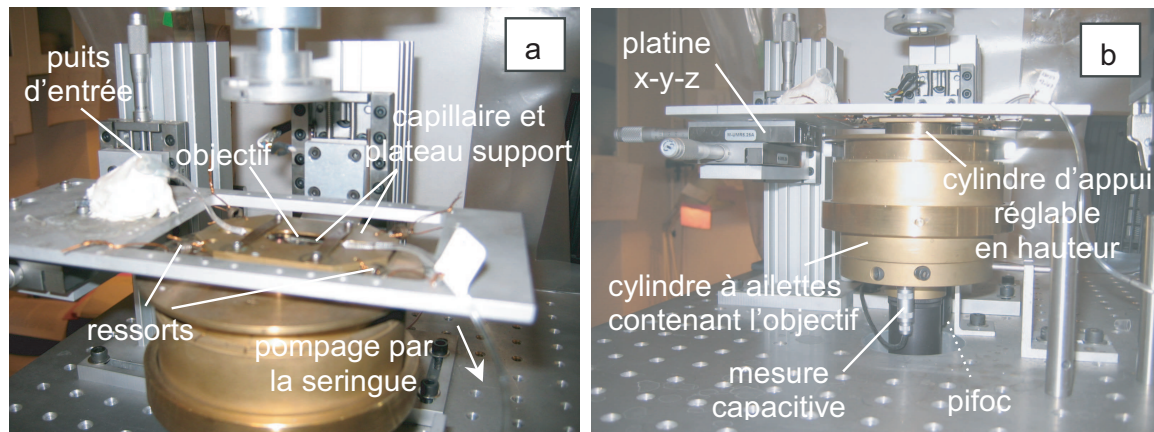


FIGURE 3.4 – L'échantillon et le porte échantillon. (a) Vue du capillaire et de son support. Ce dernier est connecté à la platine x-y-z par des ressorts qui permettent de le faire glisser au dessus de l'objectif tout en maintenant par frottements une solidarité avec le porte-échantillon sur lequel il s'appuie. (b) Le porte-échantillon, contenant l'objectif de microscope, le PIFOC et le système de mesure par capteur capacitif.

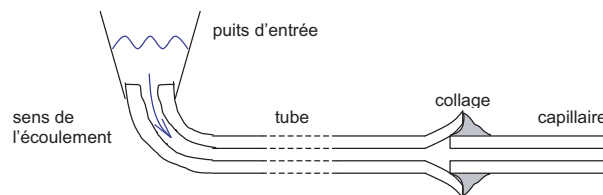


FIGURE 3.5 – Schéma du système microfluidique. Pour éviter l'apparitions de bulles d'air au cours de l'écoulement, les connexions sont agencée de façon à ce que le fluide s'écoule toujours de la section large vers la section étroite.

sont assez raides pour que le plateau glisse au dessus du cylindre lorsque la platine x-y est actionnée, mais suffisamment souples pour qu'une fois le plateau positionné, les forces de friction l'emportent sur les éventuelles dérives mécaniques que pourraient subir la platine x-y-z.

Pour pouvoir ajuster le plan focal de l'objectif (réglage nécessaire à la fois pour focaliser à la bonne hauteur dans l'échantillon, mais aussi pour l'enregistrement de l'image de référence), l'objectif de microscope est disposé sur un PIFOC (figure 3.3 et 3.4-b). Ce dernier permet de déplacer verticalement l'objectif au moyen de cristaux piezoélectriques qui se dilatent sous l'effet d'une tension électrique. Il existe cependant avec ces matériaux un phénomène d'hystérésis. Il est donc nécessaire de mettre en place une mesure de la position de l'objectif (capteur capacitif) et une boucle de rétroaction pour asservir le PIFOC en position conformément à la tension consigne.

L'étape suivante est de pouvoir ajuster la hauteur du cylindre sur lequel s'appuient le plateau et le capillaire. En effet, l'amplitude des déplacements de l'objectif par le PIFOC est de $100\ \mu\text{m}$ et l'épaisseur interne du capillaire est elle aussi de $100\ \mu\text{m}$; la hauteur du capillaire doit donc être parfaitement ajustée. Pour ce faire, le cylindre d'appui (figure 3.3 et 3.4-b) est ajusté en hauteur avant d'être bloqué au moyen d'une autre pièce cylindrique

qui fait étai grâce à des ailettes souples qui peuvent se serrer autour du cylindre. Cet étai est directement relié à la base du PIFOC, ce qui rend au final le cylindre, et donc aussi le capillaire, solidaires de l'objectif.

L'éclairage

Puisque la mesure se fait par analyse d'image (voir plus loin), la qualité de l'éclairage est ici essentielle. De plus, pour la mesure de la position des billes, la technique utilisée nécessite la création de figures d'interférences lumineuses autour des billes, ce qui impose d'éclairer l'échantillon de façon particulière : par un éclairage en lumière parallèle, issue d'une source ponctuelle et monochromatique.

Pour réaliser cette source, on utilise une LED dont la longueur d'onde est bien définie. De plus cette LED ne porte pas de calotte et le circuit lumineux est donc directement visible, ce qui rend la source lumineuse plus localisée. Pour se rapprocher en pratique d'un faisceau de lumière parallèle, il suffit que la distance entre la source lumineuse et l'échantillon soit très grande devant la focale de l'objectif de microscope. Pour ce faire, on utilise une lentille pour projeter à distance l'image du circuit de la LED au niveau de l'échantillon. Concernant la longueur d'onde de la LED, elle a été choisie en fonction du spectre de sensibilité de la caméra CCD et de la puissance de la LED afin d'obtenir une intensité lumineuse maximale. De plus, la longueur d'onde influe également sur l'allure des anneaux d'interférence ; elle a donc aussi été choisie en fonction de la qualité de la mesure, et notamment en fonction du bruit de mesure. Nous avons opté pour une LED à haute luminosité de chez Stanley, modèle FH-1011.

La régulation en température

A l'échelle moléculaire, les barrières énergétiques à franchir lors des processus biologiques sont de l'ordre de grandeur de l'énergie thermique du milieu ambiant ($k_B T \simeq 4 \cdot 10^{-21}$ J à $T \simeq 300$ K). Cette dernière est alors souvent mise à profit pour permettre le franchissement de ces barrières et elle permet ainsi d'accélérer les réactions. La température a donc une grande influence sur la cinétique ou l'équilibre des processus étudiés et il est dès lors important de la contrôler.

Un système a donc été mis en place pour thermaliser le montage. Ce dernier est tout d'abord recouvert d'une bâche pour l'isoler du reste de la pièce (Figure 3.2). Un petit radiateur (radiateur commercial soufflant dont on a éliminé les éléments de contrôle), composé d'une résistance chauffante et d'un ventilateur, injecte en permanence sous la tente un flux d'air de l'extérieur. La résistance permet de chauffer plus ou moins l'air injecté. Une sonde de température (résistance de platine) est positionnée près de l'échantillon, et une boucle d'asservissement permet de réguler la température au niveau de l'échantillon en modulant l'intensité de fonctionnement de la résistance chauffante. Il est important d'imposer en permanence un flux d'air pour que l'équilibre thermique de la tente soit obtenu le plus rapidement possible.

3.3 Mesure du mouvement des billes

3.3.1 La méthode de mesure : l'analyse d'image

L'acquisition d'image pour l'échantillon et les billes se fait au moyen d'une caméra CCD à la fréquence de 60 images par seconde (60 Hz). Après agrandissement, un pixel de la caméra correspond à une taille apparente d'environ 100 nm (0.112 μm plus précisément). Cette taille est déterminée expérimentalement en visualisant directement une mire portant une graduation microscopique (un «graticule»). La taille totale du champ de vue est de $73 \mu\text{m} \times 54 \mu\text{m}$ (Figure 3.6). L'image est numérisée avec une résolution de 8 bits en niveaux de gris (c'est-à-dire une échelle de gris de 0 à 256). Elle est ensuite envoyée à un ordinateur pour être visualisée et analysée.

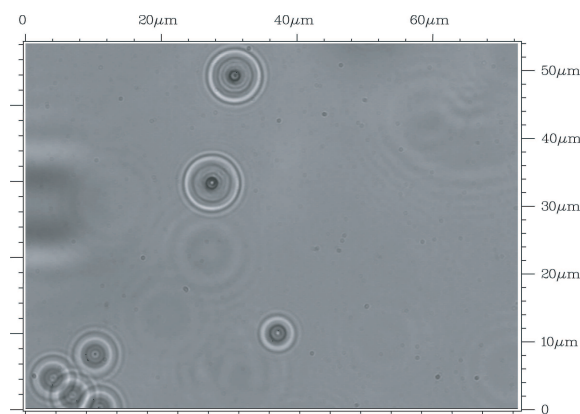


FIGURE 3.6 – Image de l'échantillon et des billes tels qu'ils apparaissent à l'écran vus par la caméra CCD.

L'analyse d'image se fait en temps réel par un programme écrit par Vincent Croquette¹ et fonctionnant sous DOS². Le but du programme est de mesurer le mouvement d'une bille dans les trois dimensions de l'espace. La bille apparaît comme un objet contrasté, éventuellement entouré d'anneaux d'interférence (voir plus loin). Déterminer la position d'une bille en deux dimensions (c'est-à-dire sa position en x-y dans le plan de l'image) est un problème classique d'analyse d'image. On souhaite ici une mesure en trois dimensions et la technique utilisée est plus complexe.

La technique consiste tout d'abord à éclairer l'échantillon de façon à créer autour des billes des anneaux d'interférence concentriques (Figure 3.7). Les interférences s'obtiennent en éclairant l'échantillon par un faisceau de lumière parallèle (ou quasi-parallèle). Ainsi, si on observe par exemple une bille collée à la surface, en déplaçant l'objectif de microscope verticalement, de façon à s'éloigner ou à se rapprocher de l'échantillon, on constate que l'allure des anneaux dépend de la focalisation et donc de la hauteur de la bille par rapport au plan focal de l'objectif : plus la différence de hauteur est grande, plus les anneaux sont nombreux et leur diamètre important (Figure 3.7-a). Inversement, si on

¹Laboratoire de Physique Statistique de l'ENS.

²Le même programme contrôle les éléments du montage tels que les aimants ou l'objectif de microscope (voir plus loin), et permet d'automatiser des séquences d'acquisition de mesures. Un travail important de programmation a donc été fait pour adapter le programme au matériel que nous avons utilisé et pour développer des fonctions d'acquisitions spécifiques à nos besoins.

maintient fixe la hauteur de l'objectif et que l'on observe une bille qui n'est pas collée à la surface, sa position va fluctuer aléatoirement dans toutes les directions en raison du mouvement brownien ; on peut alors observer des fluctuations dans l'allure des anneaux d'interférence qui traduisent ainsi les fluctuations de hauteur de la bille. Finalement, c'est l'analyse de l'allure de ces anneaux qui va permettre de déterminer la position verticale de la bille par rapport au plan focal de l'objectif.

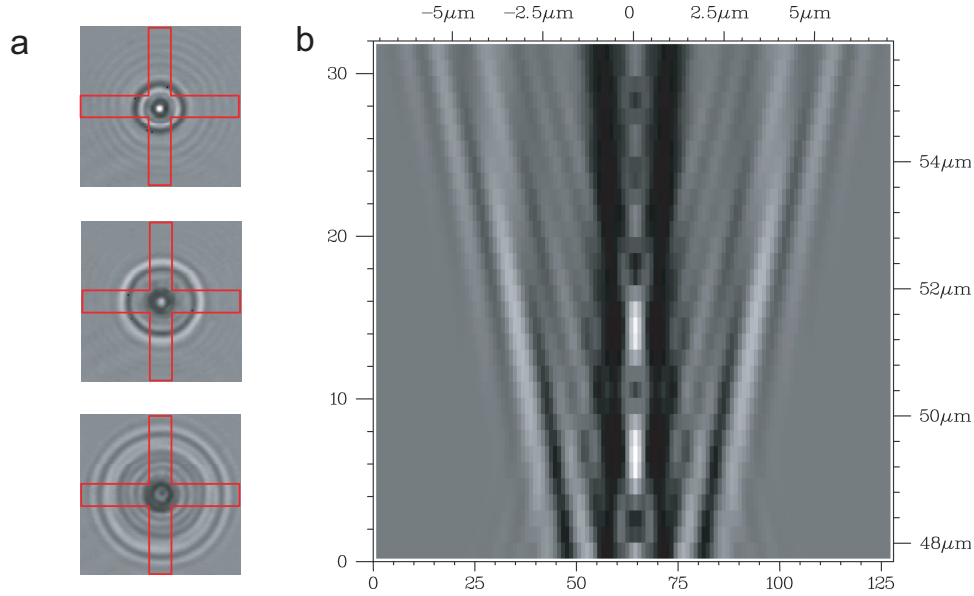


FIGURE 3.7 – *Allure des anneaux d'interférence. (a) Allure des anneaux d'une bille tels qu'ils apparaissent lorsque le plan focal est déplacé vers le haut par pas de $4\text{ }\mu\text{m}$ (photo du haut vers le bas). La croix rouge définit la zone carrée utilisée pour l'analyse et la largeur des bras définit la partie utilisée pour calculer le profil en (b) (voir texte). (b) Profil radial en fonction de la hauteur - Profil servant d'image de référence pour la mesure en z de la position de la bille.*

3.3.2 Mesure de la position d'une bille en deux dimensions

Pour la mesure de la position d'une bille en x-y, on restreint tout d'abord l'analyse de l'image de l'échantillon à la seule zone du champ de vue utile au suivi de la bille. Cette zone est une vignette carrée de 128×128 pixels (environ $14\text{ }\mu\text{m}$ de large), recentré sur la bille à chaque image. Le centre de la bille dans une vignette est déterminé par autocorrélation de l'image sur elle-même, ce qui permet de déterminer l'écartement du centre de la bille par rapport au centre de la vignette. Ici et par la suite, toutes les corrélations sont calculées par le programme en utilisant des transformations de Fourier rapides (FFT³). En fait, à chaque nouvelle image (image n), la vignette est positionnée par rapport à la position de la bille telle qu'elle apparaissait dans l'image précédente (image $n-1$), et ainsi de suite.

Il est important de restreindre l'étendue de l'image à analyser, d'une part pour que les autres billes présentes dans le champ de vue ne perturbent pas l'analyse, mais aussi

³FFT = Fast Fourier Transform.

pour diminuer au maximum les temps de calcul afin que l'ordinateur puisse faire l'analyse dans l'intervalle de temps séparant deux images ($1/60^{\text{e}}$ de seconde $\simeq 17$ ms). De plus, afin que la fraction maximale du temps disponible entre chaque image puisse être consacrée à ce temps de calcul pour l'analyse d'image, seule la partie de l'image correspondant la vignette est lue sur la caméra CCD et affichée à l'écran. On économise ainsi du temps à la fois dans l'étape de lecture de la caméra CCD et aussi dans l'étape de rafraîchissement de l'affichage.

3.3.3 Mesure de la position verticale d'une bille

Le profil radial

La mesure de la position en z de la bille utilise la variation du profil radial de la bille en fonction de sa position verticale. Le profil radial d'une bille, telle qu'elle apparaît dans la vignette carrée, est obtenu uniquement à partir d'une zone en croix contenue dans la vignette (figure 3.7-a). L'intensité à une distance donnée du centre de la bille est moyennée sur la largeur des quatre bras de la croix pour obtenir un profil radial moyen.

Image de référence

L'image de référence d'une bille est l'image du profil radial des anneaux d'interférence de la bille selon l'axe vertical (figure 3.7-b). L'image de référence est déterminée initialement et utilisée ensuite pendant toute la durée de l'expérience. Une nouvelle image de référence est déterminée pour chaque nouvelle bille d'intérêt.

Pour l'enregistrement de cette image, on applique tout d'abord sur la bille une force de traction suffisamment importante pour réduire son mouvement brownien et la maintenir à une hauteur fixe. L'objectif de microscope est ensuite déplacé verticalement par pas de 256 nm, déplaçant ainsi le plan focal au dessus de la bille. A chaque pas, l'analyse d'image à deux dimension décrite précédemment est effectuée afin de centrer la vignette sur la bille, puis le profil radial d'intensité des anneaux est enregistré. En fait, pour chaque position verticale de l'objectif de microscope, 8 images sont utilisées pour calculer la moyenne du profil radial. C'est une façon de diminuer le bruit dans l'image de référence.

En général, on enregistre le profil sur une hauteur de $8.2\mu\text{m}$ (i.e. 32 pas), mais la taille et le nombre des pas peuvent être modulés selon la taille de l'ADN utilisé.

Mesure de la position en z d'une bille à partir de son image de référence

Pendant une expérience, la position de l'objectif de microscope est fixe, et on utilise la même zone carrée décrite précédemment pour suivre le mouvement d'une bille. A chaque image, la vignette carrée est recentrée sur la bille, donnant ainsi sa position en x - y , puis le profil radial moyen est calculé. Ce profil est alors comparé aux profils radiaux contenus dans l'image de référence en appliquant une seconde fonction de corrélation, ce qui permet de déterminer la position en z de la bille.

Cette technique permet donc de suivre en temps réel la position d'une bille dans les trois dimensions de l'espace. Il faut cependant remarquer que pour enregistrer l'image de référence, c'est l'objectif de microscope que l'on a déplacé dans l'huile d'immersion, alors qu'au cours de l'expérience c'est la bille qui se déplace dans l'eau. Le rapport d'indice optique de l'eau sur celui de l'huile intervient alors comme facteur multiplicatif dans la

détermination de la mesure de la hauteur de la bille. Le rapport d'indice dépend de la solution introduite dans le capillaire et peut varier de 0.9027 pour notre solution utilisée de façon standard, à 0.9125 pour une solution contenant 10% de glycérol, en passant par 0.9068 pour une solution contenant 200 mM de potassium-glutamate.

Origine de la mesure en z

La méthode de mesure décrite ci-dessus permet uniquement de déterminer la position d'une bille relativement à l'objectif de microscope (position x-y par rapport au centre de l'axe optique et position en z par rapport au plan focal). Or nous voulons mesurer par exemple l'extension de la molécule d'ADN à laquelle la bille est reliée. Il nous faut donc déterminer la position de la surface du capillaire qui doit nous servir d'origine pour les mesures de hauteur. Pour ce faire, une fois l'image de référence enregistrée, on relâche la traction sur la bille qui peut alors tomber sous l'effet de la force de gravité et se poser sur la surface inférieure interne du capillaire. La position verticale de la bille à ce moment là sert alors d'origine pour la mesure en z.

3.3.4 Précision de la mesure et dérives mécaniques

Lorsque l'on mesure par analyse d'image la position d'une bille collée et immobile à la surface, le bruit de mesure est d'environ 5 à 10 nm. En revanche, il existe d'importantes dérives mécaniques qui constituent la principale source de bruit. Ces dérives sont essentiellement d'origine thermique. En effet, le système de régulation en température, en chauffant par intermittence, fait se dilater et se contracter les pièces mécaniques ou influe sur les optiques. Il en résulte un déplacement relatif de l'échantillon et du plan focal de l'objectif, déplacement qui vient s'ajouter, lors de la mesure, au véritable déplacement des billes.

Pour s'affranchir de l'effet de telles dérives, les précautions suivantes sont prises. Tout d'abord, pendant l'expérience, en plus de la bille accrochée à l'extrémité de la molécule d'ADN étudiée, on mesure la position d'une autre bille, collée à la surface du capillaire et qui sert de point de référence. C'est par rapport à elle que sont mesurés les déplacements de la bille d'intérêt. Par ailleurs, les dérives thermiques peuvent aussi survenir pendant l'acquisition de l'image de référence, pouvant induire par la suite une non-linéarité dans la mesure de la position verticale de la bille. Le seul moyen de réduire cet effet est d'enregistrer l'image de référence le plus rapidement possible. On arrive ainsi à obtenir une précision d'environ 20 nm en absolu sur plusieurs microns (voir chapitre 6).

3.4 Calibration de l'instrument : la mesure de force

On pourra trouver plus de détails sur cette question de la calibration dans les thèses de Jean-François Allemand [203] et Terence Strick [204]. Néanmoins, je m'efforcerai d'en présenter ici les points essentiels.

Principe

Le système ADN-bille soumis au champ magnétique des aimants est équivalent à un pendule qui serait constitué d'un ressort (l'ADN) et d'un poids (la bille), le tout

étant soumis au champ de force produit ici par les aimants⁴. En outre, la bille subit également de la part du fluide une force de friction due à la viscosité du milieu, et une force stochastique due au bombardement de la bille par les molécules du fluide entraînées par l'agitation thermique. C'est cette force aléatoire qui est responsable du mouvement brownien de la bille. Le principe de la mesure de la force de traction exercée par les aimants repose sur l'analyse du mouvement brownien de la bille et sur le théorème d'équipartition de l'énergie, ainsi qu'il est détaillé plus bas.

La configuration du système est représentée sur la figure (3.8). Les aimants exercent sur la bille une force de traction F dirigée vers le haut, imposant une extension l à la molécule d'ADN. Lorsque sous l'effet d'une fluctuation la bille s'écarte d'une distance

$$\delta x = l \cdot \sin(\theta)$$

de sa position d'équilibre horizontale, elle subit une force de rappel

$$F_x^{rappel} = -F \cdot \sin(\theta) = -F \frac{\delta x}{l}.$$

Pour les fluctuations horizontales, le système est donc équivalent à un ressort exerçant une force de rappel

$$F_x^{rappel} = -k_x \delta x,$$

et ayant pour raideur :

$$k_x = \frac{F}{l}. \quad (3.1)$$

Remarque : selon l'axe vertical, la raideur du système est simplement la raideur de la molécule d'ADN. Ainsi, si la bille s'écarte verticalement d'une distance δl de sa position d'équilibre l , elle subira une force de rappel

$$F_z^{rappel} = -k_z \delta l$$

avec

$$k_z = \left(\frac{\partial F}{\partial l} \right)_l.$$

D'après le théorème d'équipartition de l'énergie, l'énergie d'un système en équilibre avec un bain thermique se répartie à parts égales de $\frac{1}{2}k_B T$ sur chacun des degrés de liberté du système, où k_B est la constante de Boltzmann et T la température en Kelvin. On en déduit donc pour l'énergie de notre ressort selon la direction x la relation :

$$\frac{1}{2}k_x \langle \delta x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T. \quad (3.2)$$

⁴En fait la force exercée sur la bille est la résultante de la force induite par les aimants et du poids dû à la densité de la bille. Cette dernière composante (de l'ordre de 70 fN pour les billes Dynal M-270 qui ont une densité de 1.6 pour un rayon de 1.4 μm) n'est pas négligeable à très basse force mais seule la résultante des deux termes nous intéresse, et l'on parle de "la force exercée sur la bille" sans préciser la part relative des deux composantes.

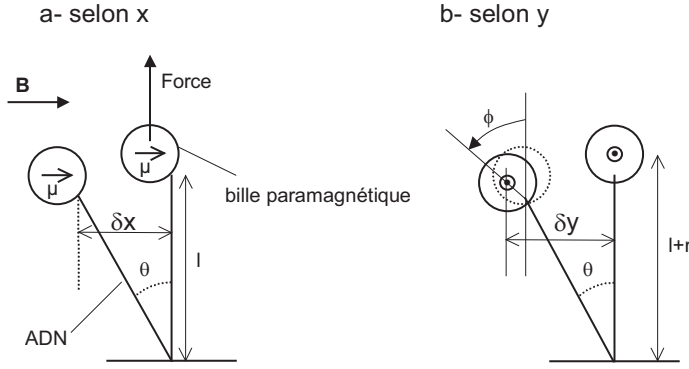


FIGURE 3.8 – **Principe de la mesure de force.** Géométrie de la configuration moléculaire et fluctuations latérales de la bille autour de sa position d'équilibre. Le point d'ancrage de l'ADN n'est pas nécessairement au plus bas de la surface de la bille. (a) Déplacement $\delta x = l \cdot \sin(\theta)$ selon la direction du champ magnétique B . Selon cette direction, le moment magnétique μ empêche la bille de pivoter par rapport au point d'ancrage ADN-bille. Le déplacement latéral δx de la bille est égal au déplacement du point d'ancrage, et donc au déplacement de l'extrémité de la molécule. (b) Déplacement δy selon la direction perpendiculaire à celle du champ magnétique. Selon cette direction, la bille peut pivoter autour de son moment magnétique et donc autour du point d'ancrage ADN-bille. Les fluctuations latérales $\delta y = l \cdot \sin(\theta) + r' \cdot \sin(\phi)$ de la bille sont supérieures à celles de l'extrémité de la molécule.

Des relations (3.1) et (3.2) on tire donc :

$$F = k_x l = k_B T \frac{l}{\langle \delta x^2 \rangle} \quad (3.3)$$

où la température T , l'extension l de l'ADN et les fluctuations latérales $\langle \delta x^2 \rangle$ de la billes sont des grandeurs directement mesurables.

Remarque : la figure 3.8-b illustre les fluctuations de la bille selon l'axe y perpendiculaire au champ magnétique. Dans cette direction, la bille peut pivoter autour de son moment magnétique et autour du point d'ancrage ADN-bille, de sorte que les déplacements de la bille selon cet axe sont supérieurs à ceux de l'extrémité de la molécule d'ADN. Il en résulte une sur-estimation des fluctuations $\langle \delta y^2 \rangle$, et donc une sous estimation de la force si on utilise l'équivalent de la relation (3.3) : $F = k_B T \cdot l / \langle \delta y^2 \rangle$.

Cela étant, si l'on cherche à appliquer directement la relation (3.3) en travaillant dans l'espace direct pour évaluer les fluctuations $\langle \delta x^2 \rangle$, on ne peut pas prendre en compte d'importants effets tels que les dérives, qui peuvent conduire à sur-estimer l'amplitude des fluctuations. Un autre type de problème provient du fonctionnement de la caméra qui, en intégrant le signal pendant $1/60^e$ de seconde, moyenne les déplacements de la bille sur cette courte période de temps. Cet effet entraîne une sous-estimation de l'amplitude des fluctuations. Pour remédier à cela, il est préférable de faire une analyse des fluctuations dans l'espace des fréquences, traitement que nous allons maintenant aborder.

L'analyse en fréquence

Le mouvement d'une particule, telle que notre bille, plongée dans un fluide visqueux et subissant une force extérieure $\mathbf{F}(t)$ obéit à l'équation de Langevin [205] :

$$m \frac{d\mathbf{v}(t)}{dt} = \mathbf{F}(t) - \alpha \mathbf{v}(t) + \mathbf{f}_a(t) \quad (3.4)$$

où :

- m et $\mathbf{v}(t)$ sont respectivement la masse et la vitesse instantanée de la bille.
- $-\alpha \mathbf{v}(t)$ est la force de friction exercée par le fluide visqueux, où α est le coefficient de friction qui vaut, pour une bille de rayon r plongée dans un fluide de viscosité η : $\alpha = 6\pi\eta r$ (loi de Stokes).
- $\mathbf{f}_a(t)$ est la force aléatoire responsable du mouvement brownien de la bille, et due au bombardement de celle-ci par les molécules du fluide entraînées par l'agitation thermique.

$\mathbf{f}_a(t)$ est une force aléatoire, de moyenne nulle $\langle \mathbf{f}_a(t) \rangle = 0$. Il est intéressant de l'exprimer dans l'espace des fréquences où elle prend la forme relativement simple d'un bruit blanc (moyennant une analyse subtile, et certaines hypothèses, sur les échelles de temps auxquelles les différents processus interviennent [205]). Ainsi, en prenant comme définition de la transformée de Fourier :

$$X(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) e^{i2\pi ft} dt$$

on obtient pour la transformée de Fourier de $f_a(t)$:

$$F_a(f) = \sqrt{4\alpha k_B T} e^{i2\pi\varphi_a(f)}. \quad (3.5)$$

Dans cette expression, $\varphi_a(f)$ est une phase aléatoire, et l'amplitude $\sqrt{4\alpha k_B T}$ de F_a est un terme indépendant de la fréquence. Sa valeur est obtenue en utilisant le «théorème de fluctuation-dissipation»⁵.

En appliquant la transformée de Fourier à l'équation (3.4) pour le mouvement de la bille selon la direction x on obtient :

$$-(2\pi)^2 f^2 m X(f) + i2\pi f \alpha X(f) + k_x X(f) = \sqrt{4\alpha k_B T} e^{i2\pi\varphi_a(f)},$$

soit

$$X(f) = \frac{\sqrt{4\alpha k_B T} e^{i2\pi\varphi_a(f)}}{k_x - (2\pi)^2 f^2 m + i2\pi f \alpha},$$

⁵Le «théorème de fluctuation-dissipation» relie le coefficient de friction α à la fonction de corrélation de la force aléatoire f_a lorsque le système est à l'équilibre thermodynamique [205] :

$$\alpha = \frac{1}{2k_B T} \int_{+\infty}^{-\infty} \langle f_a(0) f_a(t) \rangle_0 dt.$$

Les crochets signifient que l'on a réalisé une moyenne d'ensemble, et l'indice ₀ signifie que l'on a réalisé cette moyenne à l'équilibre thermodynamique.

ce qui donne pour le spectre de puissance :

$$X^2(f) = \frac{4k_B T \alpha / k_x^2}{1 + (2\pi)^2 \left(\left(\frac{\alpha}{k_x} \right)^2 - \frac{2m}{k_x} \right) f^2 + (2\pi)^4 \left(\frac{m}{k_x} \right)^2 f^4}.$$

En ordre de grandeur on a pour notre système $k_x \simeq 10^{-7}$ N/m, $m \simeq 10^{-15}$ kg, $r \simeq 10^{-6}$ m, $\eta \simeq 10^{-3}$ kg/m·s, et donc $\alpha \simeq 10^{-8}$ kg/s. On constate alors que

$$2m/k_x \simeq 10^{-8} \text{ s}^2 \ll (\alpha/k_x)^2 \simeq 10^{-2} \text{ s}^2,$$

et l'on peut donc écrire :

$$X^2(f) = \frac{4k_B T \alpha / k_x^2}{1 + \frac{f^2}{f_c^2} + \frac{f^4}{f_d^4}},$$

avec

$$f_c = \frac{1}{2\pi} \frac{k_x}{\alpha} \simeq 1 \text{ Hz}$$

et

$$f_d = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_x}{m}} \simeq 10^3 \text{ Hz}.$$

Le terme en f^4 n'intervient donc qu'à partir de $\sim 10^3$ Hz, bien au delà de la fréquence de coupure f_c du système. De plus la fréquence d'acquisition de la caméra est de 60 Hz, correspondant à une fréquence de Nyquist de 30 Hz. Le terme en f^4 peut donc être négligé et l'on obtient pour le spectre de puissance des fluctuations latérales :

$$X^2(f) = \frac{4k_b T \alpha / k_x^2}{1 + \left(\frac{f}{k_x / 2\pi \alpha} \right)^2},$$

soit une Lorentzienne d'amplitude

$$A = \frac{4k_b T \alpha}{k_x^2}$$

et de fréquence de coupure

$$f_c = \frac{k_x}{2\pi \alpha}.$$

L'amplitude des fluctuations $\langle \delta x^2 \rangle$ correspond à l'intégrale du spectre de puissance :

$$\langle \delta x^2 \rangle = \int_0^\infty X^2(f) df = A f_c \frac{\pi}{2} = \frac{k_B T}{k_x}. \quad (3.6)$$

On vérifie que l'on retrouve bien le résultat (3.2) du théorème d'équipartition de l'énergie, nous n'avons donc pas perdu d'information par rapport à un traitement dans l'espace direct.

En ordre de grandeur on obtient ici $A \simeq 0.01 \mu\text{m}^2\text{s}$, $f_c \simeq 1$ Hz et $\langle \delta x^2 \rangle \simeq 0.01 \mu\text{m}^2$.

La mesure de $\langle \delta x^2 \rangle$ revient alors à déterminer les paramètres f_c et A . Il suffit donc, à partir de la mesure des mouvements de la bille, de calculer le spectre associé et de l'ajuster par une Lorentzienne (figure 3.9). Les relations (3.6) et (3.3) permettent donc, avec la mesure de la température T et de l'extension l de la molécule, d'en déduire la force exercée sur la bille.

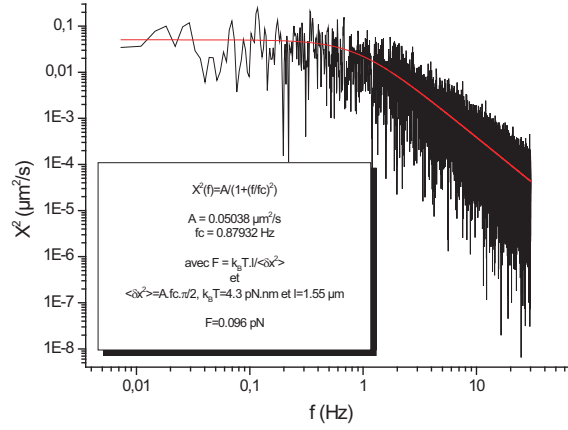


FIGURE 3.9 – Exemple de spectre de puissance. La courbe rouge est le résultat d'un ajustement par une Lorentzienne. Les paramètres obtenus et la force correspondante sont indiqués dans l'encart.

Corrections et précisions sur la calibration en force

La figure 3.9 montre un spectre obtenu à $\simeq 0.1 \text{ pN}$. Comme il l'a été mentionné plus haut, un tel spectre est en fait altéré par rapport à une Lorentzienne idéale pour plusieurs raisons. Tout d'abord le bruit dû aux dérives de l'instrument peut augmenter l'amplitude du spectre dans les basses fréquences. Or pour pouvoir déterminer correctement les paramètres f_c et A , il faut enregistrer les fluctuations de la bille sur une période $t_0 \gg 1/f_c$. Mais à basse force la fréquence de coupure diminue, ce qui rallonge d'autant la durée d'enregistrement. Le problème du bruit à basse fréquence est donc particulièrement prépondérant aux basses forces. Dans ce cas on ne tient pas compte du spectre aux très basses fréquences pour ajuster la Lorentzienne.

D'autre part, l'enregistrement par la caméra produit tout d'abord un échantillonnage du signal à 60 Hz , induisant un repliement du spectre à la fréquence de Nyquist de 30 Hz . Cet effet sera d'autant plus important à haute force où la fréquence de coupure du système se rapproche de la fréquence de Nyquist. De plus le signal est également intégré par la caméra sur $1/60^{\text{e}}$ de seconde, filtrant le signal par une fonction "porte" dans l'espace direct, ce qui induit dans l'espace des fréquences un filtrage du spectre par une fonction sinus cardinal : $\frac{\sin(2\pi f/60)}{2\pi f/60}$. L'analyse en fréquence, contrairement à une mesure dans l'espace direct temporel, permet de prendre en compte tous ces effets et de les corriger.

Enfin, il existe également, de manière générale, une erreur sur la détermination de l'extension l de la molécule. Cette erreur résulte tout d'abord de la difficulté à estimer la distance exacte entre la surface du capillaire et la bille. En effet, même si on laisse la bille se «poser au sol» (c'est-à-dire venir en contact avec la paroi interne inférieure du capillaire en relâchant complètement la force, le mouvement brownien fait qu'elle ne sera jamais parfaitement plaquée à la surface. Cet effet conduit à sur-estimer la hauteur de la surface du capillaire, et donc à sous-estimer l'extension l de la molécule. De plus, la molécule d'ADN n'est pas nécessairement ancrée exactement au plus bas de la surface de la bille (voir figure 3.8) ce qui conduit là aussi à une sous-estimation de l'extension l de la molécule.

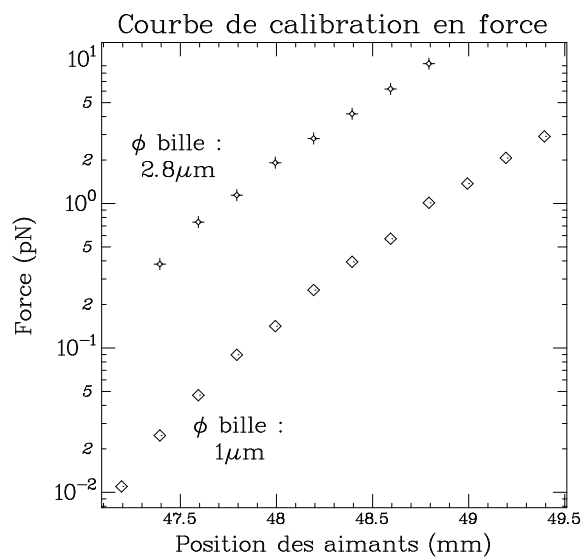


FIGURE 3.10 – *Courbes de calibration en force obtenues avec des billes de diamètre $2.8\ \mu\text{m}$ ou $1\ \mu\text{m}$. Pour une même position des aimants, une force plus faible est exercée sur les billes de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre que sur celles de $2.8\ \mu\text{m}$.*

Une courbe de calibration présentant la force pour différentes positions des aimants est illustrée sur la figure 3.10. L'incertitude sur la force, en prenant en compte les effets signalés précédemment, est d'environ $10 \sim 20\%$.

Troisième partie

Micromanipulation de la jonction de Holliday

Chapitre 4

Le pas de l'ADN en solution (article soumis)

Ce chapitre présente des expériences de micromanipulation de jonctions de Holliday individuelles. Du fait du couplage qui existe, au niveau du point de branchement d'une jonction de Holliday, entre l'échange de simples brins et la rotation des bras de la jonction selon leur axe, il est essentiel de pouvoir contrôler la molécule en torsion. On pourra ainsi étudier l'effet du sur-enroulement sur le comportement de la structure. Par ailleurs, afin d'étudier le processus de migration dans les conditions les plus simples, il est nécessaire de travailler dans un environnement où la séquence est palindromique.

Il aurait été possible de travailler sur une molécule d'ADN palindromique et qui aurait dès le départ comporté en son centre une jonction de Holliday bloquée en migration par quelques paires de bases d'hétérologie (voir au chapitre 6 la construction utilisée pour l'étude de l'activité de RuvAB). Néanmoins, une telle construction est délicate à obtenir. Nous avons donc choisi de travailler sur un ADN de séquence entièrement palindromique mais linéaire (i.e. ne comportant pas au départ de jonction de Holliday), l'idée étant d'extruder mécaniquement une jonction de Holliday en utilisant la contrainte de torsion que nous sommes capable d'exercer sur la molécule.

Ce chapitre présente des expériences réalisées à l'aide d'une telle construction palindromique. Nous avons effectivement réussi à extruder une jonction de Holliday par sous-enroulement. Nous avons également montré qu'il est possible de contrôler mécaniquement la quantité de simple brin échangée sur plusieurs milliers de paires de bases. La jonction se comporte ainsi comme un engrenage moléculaire, transformant un mouvement de rotation des bras selon leur axe en un échange de simples brins entre les branches.

De plus ces expériences ont permis d'extraire la valeur du pas de l'ADN en solution. Notre mesure expérimentale est la première à être aussi précise : 3.61 ± 0.03 nm, et elle valide la valeur habituellement utilisée mais qui n'était jusqu'à présent que présumée (voir plus loin).

L'article qui suit a été soumis pour publication.

Mechanically controlled DNA extrusion from a palindromic sequence by single molecule micromanipulation

Alexandre Dawid^{†1}, Fabien Guillemot^{†1}, Camille Brème¹, Vincent Croquette², François Heslot^{1*}

¹ Laboratoire Pierre Aigrain, Ecole Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France

² Laboratoire de Physique Statistique, Ecole Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France

[†] these authors contributed equally to this work

(Dated: December 2, 2005)

Using single molecule micromanipulation, we explore directly the torsion-induced formation of cruciform DNA from a palindromic sequence, and the subsequent extrusion of DNA. A magnetic tweezers setup is used to control both the stretching force and the relative linking number ΔLk of a palindromic DNA molecule. We show here that, in absence of divalent ions, twisting negatively the molecule while stretching it at ~ 1 pN results first in the formation of denaturation bubbles which then convert to a more stable cruciform DNA structure. Furthermore, once the cruciform DNA structure is formed, the extrusion of several kilo-base pairs of palindromic DNA sequence is directly and reversibly controlled by varying ΔLk . As DNA extrusion reduces the molecule extension, the branch point behaves as a nanomechanical gear that links rotation with translation. Indeed we obtain experimentally a very good linear relationship between the extension of the molecule and ΔLk , a feature related to the pitch of the DNA double helix. We also use this experiment to obtain a precise measurement of the pitch of B-DNA in solution : 3.61 ± 0.03 nm/turn.

PACS numbers: 87.14Gg, 87.15.-v, 87.15.He, 87.15.La,

Keywords: DNA, single-molecule, Holliday junction, recombination, branch migration

Cruciform DNA structures may be encountered *in vivo*, for example at sites of inverted DNA repeats, or during homologous recombination events where they are termed "Holliday junctions" and perform strand exchange between two homologous DNA molecules [1, 2]. Early models [3–5] and previous bulk experiments on plasmids [6–9] suggest that, due to the helicity of DNA, the formation of cruciform DNA and subsequent branch point migration (or strand exchange) may be controlled by mechanical torsion on a palindromic DNA sequence (*i.e.* on a sequence with a two-fold symmetry about its center). In the present work we use a single-molecule micromanipulation technique to explore directly these properties.

We use a magnetic tweezers setup [10, 11] to micro-mechanically control a ~ 12 kb long palindromic DNA molecule [12]. The molecule is tethered between a glass surface and a paramagnetic bead. Multiple attachments at the extremities of the molecule ensure that the molecule is rotationally constrained. A pair of magnets, motor-controlled above the sample, imposes the force and the rotation applied to the bead. Using video-microscopy and image analysis of each video frame, the vertical and lateral positions of the tethered bead with respect to the surface of the sample is determined in real time. The extension of the molecule is deduced from the measurement of the average vertical position of the bead. The lateral Brownian fluctuations of the bead is analyzed to deduce, using the equipartition theorem, the vertical force exerted on the molecule [10].

Fig.1 shows an example of measurement of the extension of a palindromic DNA molecule as a function of the

relative linking number ΔLk for two levels of force. At low force (typically < 0.5 pN), positive or negative values of ΔLk induce the formation of plectonemes, resulting in a symmetric reduction of the extension of the molecule around the torsionally relaxed state $\Delta Lk = 0$ (Fig.1, circles). At higher forces ($\simeq 1-2$ pN), the formation of plectonemes for negative values of ΔLk is prevented by the creation of denaturation bubbles [13] (Fig.1, squares, arrow 1).

With the palindromic substrate used here, for sufficiently negative values of ΔLk (typically -50 to -400 turns, depending on the conditions) an abrupt and irreversible shortening of the extension occurs (Fig.1, squares, $\Delta Lk = -270$ turns); after which, as long as ΔLk stays negative, the system can be displaced reversibly back and forth along a well defined slope (Fig.1, open diamonds and data not shown), showing that it is now at equilibrium.

Several arguments indicate that this transition corresponds to the formation of a cruciform DNA structure and that the slope corresponds to subsequent strand exchange (see Fig.2): (i) The order of magnitude of the slope is in accordance with a rotationally-induced strand exchange where each new turn added to the molecule produces the exchange of one turn of DNA through the branch point, varying the extension accordingly (see detailed analysis later). (ii) Once the shortening jump has occurred, the initial extension of the relaxed state is progressively recovered by decreasing ΔLk down to 0, as expected upon disappearance of the cruciform structure; also, the only way to return to the initial configuration and form again denaturation bubbles by uncoiling, is to

reach the value $\Delta Lk = 0$ (data not shown). (iii) As expected for the formation of a cruciform structure and consistent with previous experiments on plasmids [14], a lower degree of uncoiling is needed for the transition to occur if the temperature is raised from 25°C to 37°C (data not shown). (iv) Consistent with previous experiments [14–16], magnesium ions dramatically hinder the transition and strongly affect the kinetics of the migration (manuscript in preparation).

In the present conditions, without magnesium ions, the strand exchange is found to occur faster than the instrumental rotational speed limit of 6 tr/sec (data not shown). Once the Holliday junction is formed, the local value of the slope $dExt/d\Delta Lk$ appears (at a given force) to be constant within our instrumental resolution: no sequence-specific (hence ΔLk -dependant) change of slope was detected (data no shown).

The cruciform DNA structure behaves like a nanomechanical gear that can be rotationally driven and that smoothly and reversibly converts linking number changes into vertical displacement. In the following, we use this remarkable feature to measure the helical pitch of DNA in solution.

The slope ($slope(F)$) of a migration curve depends on the vertical force F applied (Fig. 3). Because of the ther-

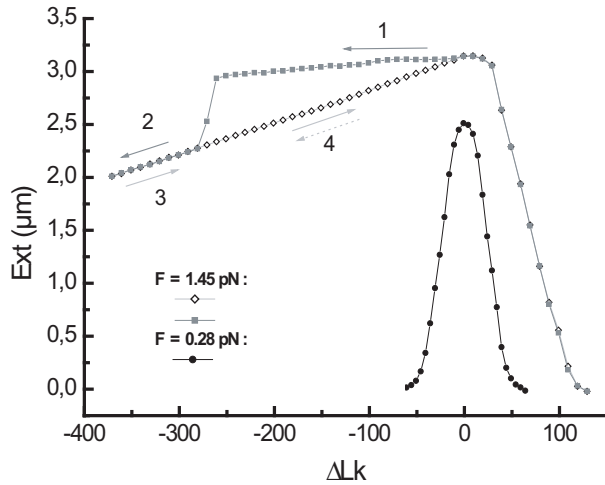


FIG. 1: Extrusion of a palindromic DNA molecule. Example of measurement of the extension (Ext) vs. the relative linking number (ΔLk) of a palindromic DNA molecule, for two levels of force, respectively 0.3 pN and 1.5 pN. The curves are obtained by averaging the extension every 10 turns for a period of 1 s to 4 min depending on the force level (arrows indicate the direction of rotations). Buffer conditions : 25 mM Tris-Acetate pH 8, 0.5 mM EDTA, 0.1 % BSA, 0.01 % NaN₃, T = 27°C. The slope of the curve segments 2,3,4 is ~ 3.1 nm/turn

mal agitation, the conformation of the molecule in space is fluctuating: in the force range studied, the molecule is not straight and the extension measured corresponds to the contour length \mathcal{L} of the molecule scaled by a factor smaller than 1 (the relative extension λ) : $Ext = \lambda \cdot \mathcal{L}$, where λ depends on the force; the slope corresponds then to the pitch p of DNA scaled by the relative extension λ of the molecule :

$$slope = dExt/d\Delta Lk = \lambda \cdot \Delta \mathcal{L}/d\Delta Lk = \lambda \cdot p \quad (1)$$

The curves obtained at different levels of force with an individual molecule form a spindle of lines that appear to converge toward a common intersection point. This intersection corresponds to the value of ΔLk for which the length of DNA in the vertical arms is zero. This point is determined by fitting each curve with a straight line while imposing a common intersection as a free parameter. Experimentally, this intersection point may not be reached for two reasons : (i) because of the labelling method for the molecules extremities [12], there may not be an exactly equal length of DNA available for the strand exchange on each vertical arm; (ii) since the bead can freely rotate only about the direction of its paramagnetic momentum, which is imposed by the magnetic field, the anchoring position of the DNA may not be at the lowest position of the bead surface [17]; this leads to a steric hindrance between the bead itself and the capillary surface at short extensions.

In spite of the remarks above, the extrapolated intersection point gives, firstly, the total number of helical turns (Lk_{tot}) initially present within the molecule between the proximal biotin and digoxigenin attachments

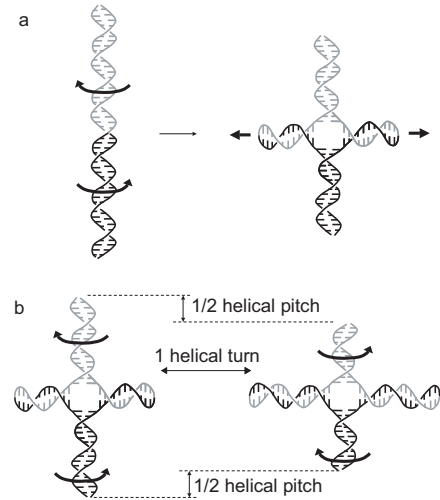


FIG. 2: Coupling between torsion and extrusion (arrows) for a palindromic DNA sequence. The grey and black double strands are related by a two-fold symmetry. (a) Cruciform DNA formation. (b) Strand exchange or branch point migration.

(because of the labelling method for the extremities of the molecules [12], this value may differ slightly between molecules). Secondly, it gives the exact zero extension reference which is then used here in order to improve the precision of both the extension and the force measurements (see supplementary information).

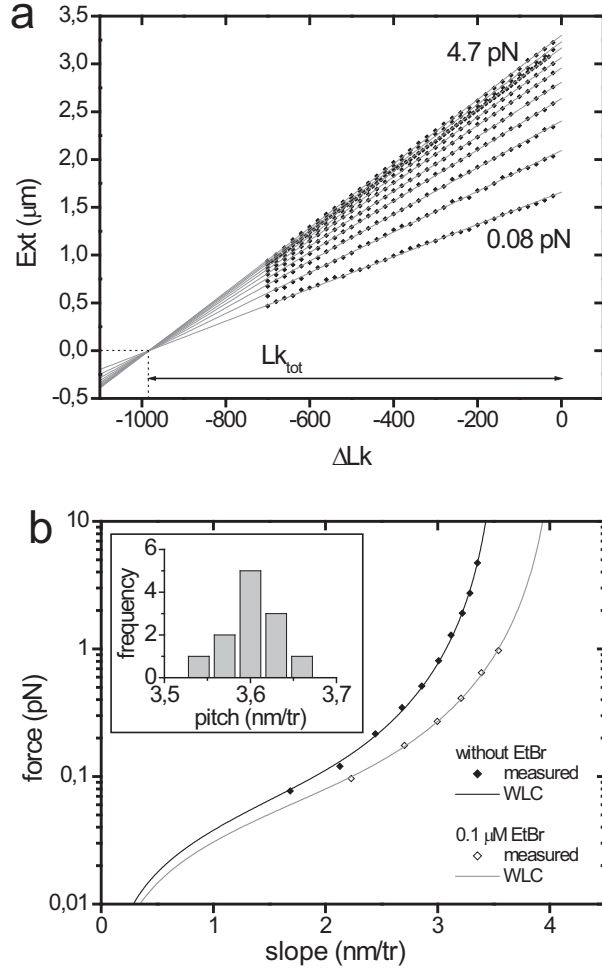


FIG. 3: Helical pitch measurement. (a) Migration curves (Ext vs. ΔLk) at forces from 0.08 pN to 4.7 pN (buffer as in Fig. 2, $T = 37^\circ C$). Each curve is obtained by averaging together a forward and reverse extrusion. The same DNA molecule is used for all data points in this figure. Identical results are found on other molecules. Grey lines : linear fits with a common intercept imposed. (b) Force vs. slope ($slope = dExt/d\Delta Lk$). Full diamonds : results from the linear fits of the spindle in (a). Open diamonds : same experiment on another molecule in the presence of 0.1 μM of ethidium bromide (EtBr). Solid lines : fits using the WLC model (see text). Results : black line : $p = 3.59 \pm 0.01$ nm/turn, $L_P = 50 \pm 3$ nm, $\chi^2 = 6.79$; grey line : $p^{0.1EB} = 4.12 \pm 0.05$ nm/turn, $L_P^{0.1EB} = 52 \pm 5$ nm, $\chi^2 = 0.35$. Inset : pitch distribution obtained from 12 different DNA molecules in the absence of EtBr.

The relative extension of DNA as a function of force $\lambda(F)$ is well described by the Worm-Like-Chain (WLC) model [18] with only one parameter : the persistence length L_P of DNA [19, 20]. Therefore, from the relation $Ext(F) = \mathcal{L} \cdot \lambda(F)$, one can deduce the contour length \mathcal{L} of a molecule by fitting its force-extension curve with the WLC model, and with \mathcal{L} and L_P as free parameters. Since the migration spindle gives also the total number Lk_{tot} of helical turns present inside the molecule, we have here all the elements to determine the helical pitch of DNA in solution $p = \mathcal{L}/Lk_{tot}$. Equivalently, the pitch p can also be determined directly by fitting the curve $slope(F) = p \cdot \lambda(F)$ with the WLC model, and with p and L_P as free parameters. In the following we apply this second method. We use for the WLC model, the analytical approximation obtained by Bouchiat *et al.* [21] which approaches the exact solution to 0.01%.

The black solid line in Fig.3(b) corresponds to the fit of the relation $slope(F)$ using the data (Fig.3(b), full diamonds) obtained from the spindle in Fig.3(a). We obtain for this particular experiment $p = 3.59$ nm/turn and $L_P = 50$ nm. By averaging the results of identical experiments on 12 different molecules (see inset figure 3(b) and Table I), we obtain $p = 3.61 \pm 0.03(SD)$ nm for the pitch of DNA in solution and $L_P = 50 \pm 2(SD)$ nm for the persistence length.

As a control that we measure the helical pitch of DNA, and to illustrate the sensitivity of our measurement, we have performed similar experiments in the presence of ethidium bromide, known to change the helicity of DNA upon intercalation [22] (Fig. 3(b), open diamonds). Accordingly we found a significant increase of the pitch of the molecule. Also, in accordance with previous measurements [17], we found no significant variation of the persistence length (Tab. I).

Does the force exerted on the structure alter significantly the pitch measured ? Indeed, stretching on two opposite arms of a cruciform DNA structure while imposing a fixed linking number may displace the equilibrium position of the branch point toward a lengthening of the tethered arms and also, consequently, toward their uncoiling. This effect may result in an artificial increase of the pitch measured. However, theoretical arguments and control experiments show that in our experiment this effect is insignificant (see supplementary info).

Finally, we have tested the effect of changing the temperature, salt and pH conditions (Tab. I). In the range of conditions explored, and consistent with previous measurements [23], we found slight variations of the persistence length, but we detected no significant effect on the pitch of DNA.

It is to be noted that the value of the pitch of DNA *in solution* found in textbooks [24, 25] is only indirectly inferred by taking an helical periodicity of 10.5 bp/turn [27, 28] and assuming a rise of 0.34 nm/bp identical to that found in crystals [26](even though effects of crystal

TABLE I:
Helical pitch of DNA (p) and persistence length (L_P)

condition	p (nm) ($\pm SD$)	L_P (nm) ($\pm SD$)	number of molecules
standard ^a (pH 8, 37°C)	3.61 ± 0.03	50 ± 2	12
standard + 0.2 M KGlu ^b	3.59 ± 0.03	42 ± 2	3
standard but pH 7	3.59 ± 0.05	45 ± 3	6
standard but 27°C	3.64 ± 0.06	46 ± 3	2
standard + 0.1 μ M EtBr ^b	4.12 ± 0.05	52 ± 5	3

^a25 mM Tris-Acetate pH 8, 0.5 mM EDTA, 0.1% BSA, 0.01% NaN₃, 37°C

^bKGlu : potassium glutamate, EtBr : ethidium bromide

packing might induce a change of the rise between the liquid environment, and the crystal). On the other hand, a value of ~ 3.3 nm/bp for the rise has been found [29] by transient electric birefringence on small DNA fragments, but it involves a hydrodynamic model. Other measurements in liquid are for example the direct measurement by AFM [30] of the pitch (with low resolution), or the measurement of the average rise of DNA (contour length measurement by electron microscopy [31] on a DNA with a known number of bases); those however both involve the adsorption of DNA on a surface, hence possibly artifacts on the configuration of DNA. Our measurement in solution (3.61 ± 0.03 nm) (i) is significantly more precise than previous estimates, and (ii) confirms the 3.6 nm value usually assumed for the pitch of DNA in solution.

In conclusion, the present experiment is the first direct demonstration that branch migration can be controlled over a considerable molecular distance, by the relative linking number. The process in the absence of divalent ions appears to be fast (> 6 turns/sec) and reversible. Such molecular configuration with a Holliday junction appears to be a prototype of a nanomechanical device that converts rotation to translation.

Acknowledgements. We thank R. Lavery and Y. Tim-sit for discussions, Z. Podemska for her technical help, and O. Saleh for his critical reading of the manuscript. This work has been funded by CNRS, MJENR, ACI "nano" and Universités Paris 6 and Paris 7. A.D. has a study fellowship from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

- [1] N. Siegal & B. Alberts, J. Mol. Biol. **71** 789 (1972)
- [2] H. Potter & D. Dressler, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **73** 3000 (1976)
- [3] J. R. Platt, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **2** 181 (1955)
- [4] R. Holliday, Genet. Res. **5** 282 (1964)
- [5] A. Gierer, Nature (London) **212** 1480 (1966)
- [6] D.M.J. Lilley, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77** 6468 (1980)
- [7] N. Panayotatos & R.D. Wells, Nature (London) **289** 466 (1981)
- [8] K. Mizuuchi, *et al.*, J. Mol. Biol. **156** 229 (1982)
- [9] X.P. Yang, *et al.*, Biopolymers **45** 69 (1998)
- [10] T.R. Strick *et al.*, Science **271** 1835 (1996)
- [11] A. Dawid *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101** 11611 (2004)
- [12] The palindromic DNA molecule is obtained by head-to-head ligation of two identical 5.92 kb DNA duplexes, each prepared with the same protocol as for the "A fragment" described in [11] except that one is labelled with digoxigenin-modified nucleotides (dig) and the other with biotin-modified nucleotides (biot). The resulting DNA fragments are labelled at one extremity only (multiple ligands spanned over approximatively 1kb), and the other extremity has a ligatable 4 bases overhang (HindIII cut). The ligation results in palindromic dimers where a fraction is tetherable (incorporating both dig and biot fragments). The DNA sequence on each side of the centre of the palindrome is a cloned fragment of λ -phage DNA encompassing the region 23130 bp (HindIII site) to 18560 bp (KpnI site). Because of the labelling method, the exact tether length (free DNA encompassed between the bead and the surface) is not precisely known.
- [13] T.R. Strick *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95** 10579 (1998)
- [14] C.K. Singleton, J. Biol. Chem. **258** 7661 (1983)
- [15] A.J. Courey & J.C. Wang, Cell **33** 817 (1983)
- [16] I.G. Panyutin & P. Hsieh, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91** 2021 (1994)
- [17] S.B. Smith *et al.*, Science **258** 1122 (1992)
- [18] M. Fixman & J. Kovac, J. Chem. Phys. **58** 1564 (1973)
- [19] An elastic modulus could be added as an enthalpic elastic term into the model, however we constrained our measurements to forces below 5 pN where this enthalpic effect is negligible.
- [20] S.B. Smith *et al.*, Science **271** 795 (1996)
- [21] C. Bouchiat *et al.*, Biophys. J. **76** 409 (1999)
- [22] J.C. Wang, J. Mol. Biol. **89** 783 (1974)
- [23] C.G. Baumann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94** 6185 (1997)
- [24] L. Stryer *et al.*, "Biochemistry", (Freeman, W. H, New York, ed. 5th Ed. (2002)
- [25] A. L. Lehninger *et al.* "Principle of Biochemistry", Worth Publishers, New York, ed. 2nd Ed., (1993).
- [26] W. Saenger, "Principles of Nucleic Acid Structure", Springer-Verlag, New York, (1984)
- [27] J. C. Wang, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 200 (1979)
- [28] V. V. Rybenkov *et al.* Nucl. Acids Res. **25** 1412 (1997)
- [29] J. G. Elias and D. Eden, Biopolymers **20**, 2369 (1981)
- [30] J.X. Mou *et al.*, Febs Letters **371** 279 (1995)
- [31] H.J. Vollenweider *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 710 (1978)

* heslot@lpa.ens.fr

Calibration of the vertical movements of the beads

Measurement of the vertical movements of the beads is performed using an image analysis system based on a calibration that uses controlled vertical displacements of the microscope objective [1]. These displacements of the objective are controlled via a capacitive sensor that has been calibrated at 0.4% precision with a Fabry-Perot interferometer (data not shown). Because we measure the movements of the beads via calibrated objective displacements, and because of the difference of optical index between the sample buffer and the immersion oil of the objective, a correction factor, corresponding to the ratio of these optical indices, must be applied to the apparent vertical displacements of the beads to deduce their real displacements. We experimentally checked that the correction factor indeed corresponds to the ratio of the optical indices (data not shown). This ratio has been measured at 0.01% precision (data not shown).

Refinement to the force and extension measurements

In magnetic tweezers experiments, there is usually a sizeable uncertainty on the zero extension reference. This reference is identified as the position of the glass surface which is obtained by letting the bead drop to the bottom of the sample; but this estimate is biased firstly by the continuous vertical Brownian fluctuations of the bead, and secondly by the steric hindrance of the bead itself at short extension (see text) which results in an unknown offset inasmuch as the bead radius (i.e. 500nm) between the bead-surface distance measured and the true extension of the molecule. In the present configuration, the spindle of Holliday junction migration curves allows one to determine precisely the zero extension reference (corresponding to the vertical position of the intersection point), and the extension measurements have been rectified accordingly. As an important consequence, this also reduces significantly the uncertainty on the force measurement which depends on the extension through the equipartition theorem [2].

Force effect on the pitch measured

The force exerted on the structure may alter the pitch measured. Indeed, stretching on two opposite arms of a cruciform DNA structure while imposing a fixed linking number may displace the equilibrium position of the branch point toward a lengthening of the tethered arms and also, consequently, their uncoiling. Indeed, an increase ΔL of the contour length L of the tethered arms leads to a reduction of the internal energy of the system by the value $F \cdot \Delta \text{Ext}$, where $\Delta \text{Ext} = \lambda \cdot \Delta L$ is the corresponding extension variation; but it also leads to an increase of the torsional energy by the value $(1/2)(C/L)(2\pi \Delta \text{Tw})^2$, where C is the torsional modulus of DNA, and $\Delta \text{Tw} = -\Delta L/p = -\Delta \text{Ext}/(\lambda \cdot p)$ is the slight uncoiling that results from the exchange of a length ΔL of single strands. Minimising the internal energy variation $\Delta E = -F \cdot \Delta \text{Ext} + (1/2)(C/L)(2\pi \Delta \text{Tw})^2$, one finds $\Delta \text{Ext} = F \cdot L \cdot (\lambda \cdot p)^2 / (C \cdot 4\pi^2)$ and $\Delta \text{Tw} = F \cdot L \cdot \lambda \cdot p / (C \cdot 4\pi^2)$. This effect may result in an artificial increase of the slopes of the migration curves by the value $\Delta \text{slope} = F \cdot \lambda^2 \cdot p^3 / (4\pi^2 C)$, and consequently in an overestimate of the pitch by the theoretical value of $\Delta p = \Delta \text{slope} / \lambda = F \cdot \lambda \cdot p^3 / (4\pi^2 C)$.

Taking $C \approx 400 \text{ pN} \cdot \text{nm}^2$ [3] and $p = 3.6 \text{ nm/tr}$, and imposing $F < 5 \text{ pN}$ to stay in the entropic regime of elasticity [4], it results that $\lambda < 1$, and one finds theoretically $\Delta p/p < 0.004$, which is less than the experimental standard deviation on p .

Moreover, we performed the following control experiment. At $\Delta Lk = 0$, the cruciform structure is completely intruded and the DNA is in a linear, not twisted state. Therefore, the force effect here above described cannot occur at $\Delta Lk = 0$. We can thus estimate the force effect by comparing for each level of force the extension directly measured at $\Delta Lk = 0$ to the value obtained by extrapolating the migration lines. Because the intersection point of the spindle is fixed, and because the force results in an artificial increase of the slopes of the migration curves, the extrapolated extension at $\Delta Lk = 0$ may overestimate the real extension. However, within our 20 nm resolution, we did not detect experimentally any difference (data not shown). Notice also that a 20 nm uncertainty in length for ~ 1000 helical turns results in an uncertainty of only 0.02 nm/tr on the pitch, which is less than the uncertainty on p .

1. Gosse, C. and V. Croquette, *Magnetic tweezers: Micromanipulation and force measurement at the molecular level*. Biophysical Journal, 2002. **82**(6): p. 3314-3329.
2. Strick, T.R., et al., *The elasticity of a single supercoiled DNA molecule*. Science, 1996. **271**(5257): p. 1835-1837.
3. Moroz, J.D. and P. Nelson, *Entropic elasticity of twist-storing polymers*. Macromolecules, 1998. **31**(18): p. 6333-6347.
4. Smith, S.B., Y.J. Cui, and C. Bustamante, *Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules*. Science, 1996. **271**(5250): p. 795-799.

Chapitre 5

Etudes en présence d'ions magnésium

Les résultats présentés jusqu'ici sur l'étude de la jonction de Holliday en l'absence de protéines correspondaient à des expériences réalisées en l'absence d'ions divalents. Dans ces conditions, on sait que la jonction adopte une conformation ouverte qui facilite la migration du point de branchement, rendant la situation optimale pour contrôler mécaniquement la migration.

Cependant, cette situation ne correspond pas à ce qui se passe dans les conditions physiologiques. En particulier, nous avons vu en introduction (voir chapitre 1) que la présence d'ions divalents inhibe considérablement la migration du point de branchement (ralentissement d'un facteur 1000) et que cet effet est très certainement dû à la prédominance, dans ces conditions, de la conformation empilée. Il est donc intéressant d'examiner l'influence des ions magnésium sur la capacité de la jonction à se former et à migrer sous l'effet des contraintes mécaniques que nous pouvons lui imposer dans notre configuration en molécule unique.

Cette partie décrit des expériences réalisées en présence de 10 mM d'ions magnésium. Nous allons voir que le comportement de la jonction (formation et migration) sous l'effet des contraintes mécaniques diffère nettement par rapport au cas précédent où l'on n'était pas en présence d'ions divalents. Plus particulièrement, des mesures de cinétique de migration seront effectuées, et nous verrons que ces mesures permettent de rendre compte, via un modèle simple, de la mécanique du processus de migration.

5.1 Formation de la jonction en magnésium

5.1.1 Résultats préliminaires

Comme nous l'avons vu précédemment au chapitre 4, former la jonction dans notre configuration de micromanipulation demande tout d'abord de sous-enrouler la double hélice d'ADN de façon à dénaturer partiellement la molécule. Ceci permet ensuite aux simples brins dénaturés de s'apparier sur eux-mêmes et de constituer ainsi les bras horizontaux de la jonction. La présence d'ions magnésium dans la solution a pour effet d'écranter les charges des molécules présentes en solution. Les simples brins de l'ADN étant chargés négativement, ces derniers ont tendance à se repousser, sans toutefois que cette tendance contrebalance l'énergie de liaison issue de l'appariement des bases complémentaires. Ce-

pendant, les ions en solution écrantent les charges portées par l'ADN et diminuent de façon importante la répulsion entre les simples brins. Cette effet a pour conséquence de stabiliser le double brin vis-à-vis du simple brin [206]. On peut tout d'abord penser que les ions magnésium, en rendant la séparation des deux simples brins plus difficile, imposent de franchir une barrière énergétique plus importante pour former la jonction, et vont donc défavoriser son extrusion. Mais ils peuvent également favoriser l'extrusion de la jonction en favorisant l'appariement des simples brins sur eux-mêmes pour former les bras horizontaux. Il n'est donc pas évident de prévoir l'effet que les ions vont produire. Il s'agit ici d'un problème de compétition entre un effet thermodynamique (stabilité du double brin) et un effet cinétique (formation de la jonction) [207].

Les figures 5.1 à 5.3 illustrent le comportement typique observé en présence d'ions magnésium pour la formation d'une jonction.

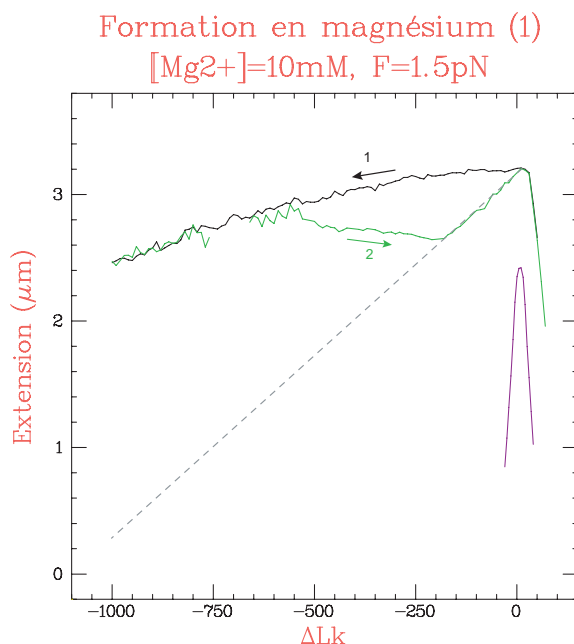


FIGURE 5.1 – **Formation de la jonction en présence de 10 mM d'ions magnésium (1)** : extension de la molécule en fonction du sur-enroulement imposé. La courbe mauve est obtenue à 0.3 pN et permet de déterminer la valeur de rotation correspondant au zéro de sur-enroulement (maximum d'extension : absence de plectonèmes). Les autres courbes sont obtenues à 1.5 pN, avec une vitesse de 2 tr/s et une mesure de l'extension tous les 10 tr, en moyennant la mesure sur 2 s. La molécule est tout d'abord sous-enroulée jusqu'à $\Delta Lk = -1000$ tr (courbe noire), puis un retour est effectué jusqu'à $\Delta Lk = +100$ tr (courbe verte). Les flèches numérotées indiquent pour chaque courbe l'ordre et le sens dans lequel le sur-enroulement est effectué.

Sur la figure 5.1, lors du sur-enroulement négatif (courbe noire), le couple exercé sur la molécule induit une dénaturation de la molécule [208], et le passage d'un ADN double brin à de l'ADN sous la forme d'un double simple brin (voir aussi chapitre 4). L'inclinaison de la courbe est essentiellement due à la différence d'extension relative entre la forme en double hélice de l'ADN et sa forme dénaturée. A la force ici choisie, l'ADN

dénaturé a en effet une extension relative plus faible que l'ADN en double hélice, d'où une diminution progressive de l'extension de la molécule au fur et à mesure de son sous-enroulement [204, 206]. Le retour (courbe verte) se fait tout d'abord de façon réversible (le tracé de retour se superpose à celui de l'aller). Nous interprétons ce comportement comme correspondant à la refermeture des bulles de dénaturation. Un décrochement est ensuite observé vers $\Delta Lk = -500$ tr. L'extension diminue alors de façon continue jusqu'à environ $\Delta Lk = -200$ tr, où la courbe rattrape alors une droite ayant une pente d'environ 3 nm/tr. Cette droite rejoint la courbe noire à $\Delta Lk = 0$ tr, et si elle était prolongée du côté négatif, l'extension serait réduite à zéro vers $\Delta Lk = -1000$ tr.

Ces éléments indiquent donc que le décrochage correspond à l'apparition de la jonction (voir chapitre 4) qui commence alors à absorber lentement les supertours dans les bras horizontaux en même temps que l'on referme progressivement les bulles de dénaturation. La pente d'environ 3 nm/tr observée est alors atteinte lorsque toutes les bulles de dénaturation se sont refermées et que l'évolution de l'extension de la molécule est alors uniquement due à la migration de la jonction sous l'effet de la torsion.

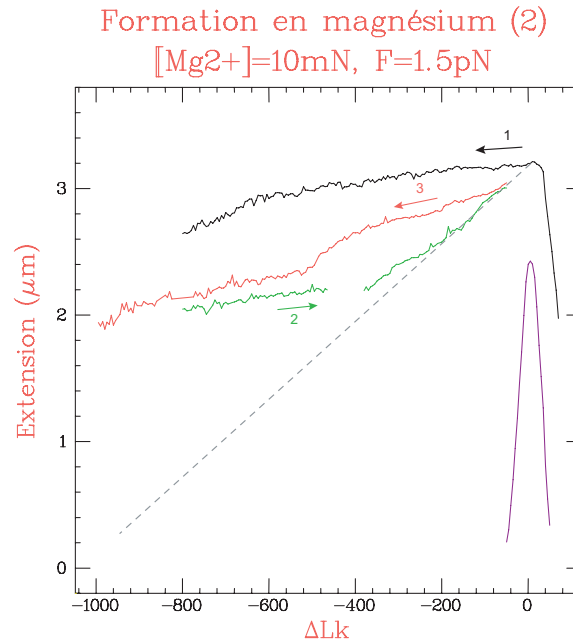


FIGURE 5.2 – *Formation de la jonction en magnésium (2)*. Mêmes conditions que figure 5.1. La molécule est sous-enroulée jusqu'à $\Delta Lk = -800$ tr (courbe noire). Après ~ 2 h de pause, un retour est effectué (courbes verte), puis la molécule est à nouveau sous-enroulée jusqu'à $\Delta Lk = -1000$ tr (courbe rouge).

Pour la figure 5.2 les conditions sont les mêmes, excepté que l'on a attendu ~ 2 h après le premier aller (courbe noire) avant d'effectuer le retour (courbe verte). Sur cette figure, comme pour la figure précédente, le retour (courbe verte) rattrape une droite qui rejoint la valeur de l'extension de la courbe noire à $\Delta Lk = 0$ tr, indiquant qu'une jonction de Holliday s'est formée dans la molécule. Cependant, deux différences apparaissent clairement par rapport à la figure 5.1 précédente. Premièrement, entre la fin du premier aller et le début du retour (passage de la courbe noire à la courbe verte), l'extension

de la molécule a diminué, indiquant que la jonction de Holliday a en partie commencé à se former mais que cette formation est lente ou a été interrompue. Deuxièmement la pente de la fin de la courbe verte (entre $\Delta Lk = -400$ tr et $\Delta Lk = -100$ tr) n'est pas aussi bien définie que sur la figure précédente, indiquant que le sous-enroulement n'a pas totalement été absorbé dans les bras horizontaux de la jonction et que les bras verticaux restent en partie dénaturés. La persistance de cette dénaturation, qui est claire jusqu'à environ $\Delta Lk = -200$ tr, suggère qu'à partir de $\Delta Lk = -400$ tr, les tours ajoutés dans la molécule entraînent en partie une migration de la jonction au lieu de refermer les bulles de dénaturation. Le fait que les bulles de dénaturation semblent ne pas pouvoir se refermer pourrait s'expliquer par la présence de structures secondaires : celles-ci auraient eu le temps de se former au cours des 2 h d'attente, piégeant ainsi les simples brins d'ADN dans une conformation empêchant leur renaturation (voir aussi figure 5.5).

Le deuxième aller (courbe rouge) décroche presque immédiatement de la courbe verte et l'extension reste au dessus de la pente d'environ 3 nm/tr que l'on attendrait dans le cas d'une migration de jonction. Ce résultat indique que le sous-enroulement entraîne la formation de bulles de dénaturation plutôt que la migration de la jonction, même si jusqu'à $\Delta Lk \simeq -500$ tr l'extension diminue plus vite que pour la courbe noire, suggérant tout de même une migration progressive mais lente de la jonction.

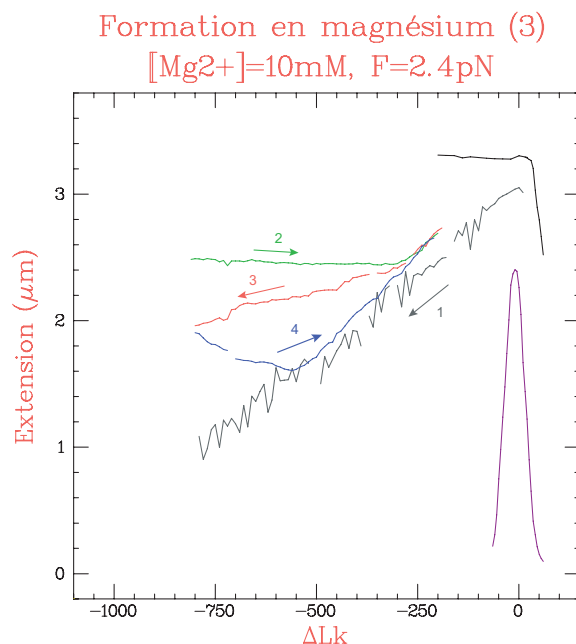


FIGURE 5.3 – **Formation de la jonction en magnésium (3)**. Même chose que pour les deux figures précédentes, excepté que la force est imposée à 2.4 pN. De plus, le premier sous-enroulement (courbe grise) est effectué à 0.9 pN. La courbe noire, obtenue à 2.4 pN, montre que l'extension reste constante sous l'effet de la dénaturation, indiquant qu'à cette force-ci et dans les conditions ioniques présentes, l'ADN double brin et sa forme dénaturée ont la même extension relative.

Pour la figure 5.3, l'expérience est similaire aux précédentes excepté que la force imposée est de 2.4 pN. Dans cette expérience, au cours du premier sous-enroulement

(courbe grise (1)), l'extension diminue de façon linéaire. Cependant, étant donné le niveau de force de 0.9 pN et la présence d'ions magnésium, cette diminution correspond, au moins en partie (voir plus bas), non pas à la migration de la jonction, mais à la formation d'ADN dénaturé dont l'extension relative est plus faible que celle de l'ADN double brin [204,206]. Cette dénaturation peut en outre être mêlée à la formation de plectonèmes et d'ADN-Z [209]. On observe d'ailleurs au cours de ce premier trajet d'importantes fluctuations, phénomène caractéristique associé à ce régime [204].

Néanmoins, à la fin de ce premier sous-enroulement à 0.9 pN, quand la force est augmentée à 2.4 pN pour le premier retour (courbe verte), l'extension de la molécule passe alors à une valeur d'environ 2.5 μm , c'est-à-dire inférieure à l'extension initiale de 3.3 μm . La courbe verte reste ensuite approximativement à la même extension jusqu'au moment où elle rejoint vers $\Delta Lk = -300$ tr une droite correspondant à la migration de la jonction. La jonction était donc déjà présente à la fin de la courbe grise et le début de la courbe verte peut donc être associé à la fermeture des bulles de dénaturation.

Au cours d'un second aller-retour (courbes rouge et bleue) un décrochement par rapport à la pente de 3 nm/tr se produit vers -300 tr lors du sous-enroulement. Cependant, une diminution progressive de l'extension signale ici un mélange de dénaturation et de migration. La courbe bleue finit par rejoindre la droite de migration vers $\Delta Lk = -550$ tr. Il ressort donc de ces courbes qu'en présence de magnésium la jonction migre facilement lorsqu'on lui impose une contrainte de torsion positive, mais dans le sens d'une contrainte de torsion négative, il y a compétition entre migration et dénaturation.

En conclusion, ces observations montrent tout d'abord que la présence du magnésium rend la formation de la jonction plus difficile. D'autre part, concernant la migration de la jonction une fois celle-ci formée, on observe une dissymétrie entre migration positive et migration négative (figure 5.3) : la migration de la jonction dans le sens positif étant visiblement plus facile et régulière que dans le sens négatif. L'interprétation de cette dissymétrie est la suivante. En présence de magnésium, la migration du point de branchement dans le sens négatif est un phénomène lent (environ une minute pour 10 tours). Ce retard à la migration quand on impose du sur-enroulement négatif induit une contrainte de torsion qui est suffisante pour commencer à ouvrir des bulles de dénaturation. Le couple maximal pouvant être exercé sur la jonction dans le sens négatif est donc limité par ce couple de dénaturation de l'ADN et il y a alors compétition entre migration et ouverture de bulles de dénaturation (le couple de dénaturation vaut environ $\Gamma_d \simeq 2 \text{ k}_B T \simeq 9 \text{ pN} \cdot \text{nm/rad}$ [210,211]). En revanche, dans le sens positif, le couple limite est le couple de formation des plectonèmes qui, aux valeurs de force ici choisies, est plus élevé que le couple de dénaturation ($\Gamma_P \simeq 17 \text{ pN} \cdot \text{nm/rad}$ à $\simeq 2 \text{ pN}$: voir paragraphe 5.3.4). Ainsi, dans le sens positif, la contrainte de torsion peut être plus élevée que dans le sens négatif, entraînant plus efficacement la migration de la jonction. Dès lors, la migration dans le sens du sous-enroulement (sens négatif) ne se fait correctement qu'à condition d'effectuer le sous-enroulement suffisamment lentement (moins de 5 tr/s).

5.1.2 Méthode employée pour la formation de la jonction en magnésium

Au vue des difficultés pour induire la formation de la jonction de Holliday en présence de magnésium, la méthode suivante a été adoptée pour arriver à la former effi-

cacement (figure 5.4) : la molécule est tout d'abord sous-enroulée jusqu'à $\Delta Lk = -600$ tr (figure 5.4-a, courbe noire). Des cycles de baisse et remontée en force sont ensuite effectués lentement (figure 5.4-b, flèches 1 à 10 : pas de 0.1 mm avec les aimants environ toutes les 30 s et une mesure pour chaque pas moyennée sur la période complète de 30 s). Au fur et à mesure des cycles, l'extension de la molécule diminue petit-à-petit. C'est le signe que la jonction s'est formée et que la migration progresse. Lorsque l'extension ne diminue plus, cela ne signifie pas nécessairement que tous les supertours négatifs ont été transférés dans les bras de la jonction. En effet lorsque la molécule est à nouveau sur-enroulée, à 2 pN, dans le sens positif (figure 5.4-a, courbe bleue), on observe d'abord un plateau d'extension constante jusqu'à environ $\Delta Lk = -400$ tr, puis la courbe rejoint la droite à ~ 3 nm/tr correspondant à la migration de la jonction. Le plateau signifie que la jonction n'a pas complètement absorbé les supertours négatifs. On peut proposer les hypothèses suivantes pour expliquer le blocage de la migration : cela peut être dû soit à la force trop élevée et qui pourrait induire une barrière énergétique à la migration, soit à la présence éventuelle de structures secondaires qui pourraient bloquer la migration (voir figure 5.5), soit à des effets de séquence qui pourraient bloquer la migration en piégeant la jonction dans une des deux conformations empilées [49].

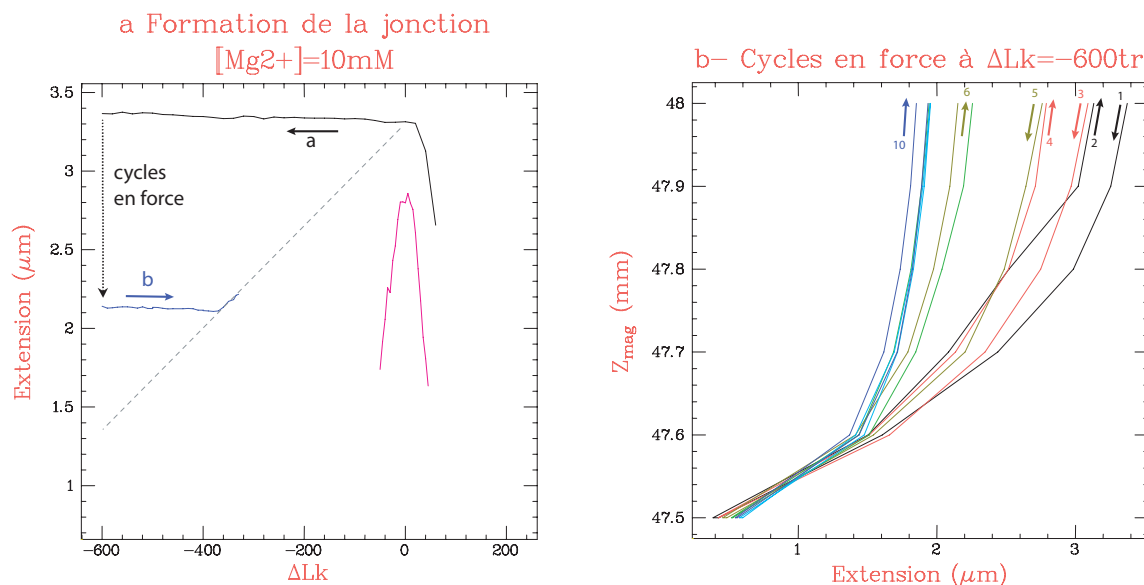


FIGURE 5.4 – **Méthode employée pour former la jonction en présence de magnésium.** a) Extension de la molécule en fonction du sur-enroulement ΔLk . La courbe violette est obtenue à 0.3 pN, les courbes noire et bleue sont obtenues à 2 pN. b) Extension de la molécule (abscisse) en fonction de la hauteur Z_{mag} des aimants. Une diminution de Z_{mag} correspond à une diminution de la force. Pour repère $Z_{mag} = 48$ mm et $Z_{mag} = 47.5$ mm correspondent ici respectivement à des forces d'environ 2 pN et 0.5 pN (voir figure 3.10). Les allers-retours sont effectués par pas de 0.1 mm avec environ un pas toutes les 30 s, et la mesure d'extension est moyennée sur toute la durée du pas.

Comme le montre la figure 5.4, cette méthode des cycles en force permet d'obtenir l'extrusion de la jonction même dans les conditions défavorables où il y a présence d'ions divalents. Cependant, à la fin du cycle, la molécule doit être systématiquement sur-

enroulée dans le sens positif pour fermer les bulles de dénaturation restantes et vérifier ainsi que tous les supertours négatifs sont bien absorbés dans la jonction.

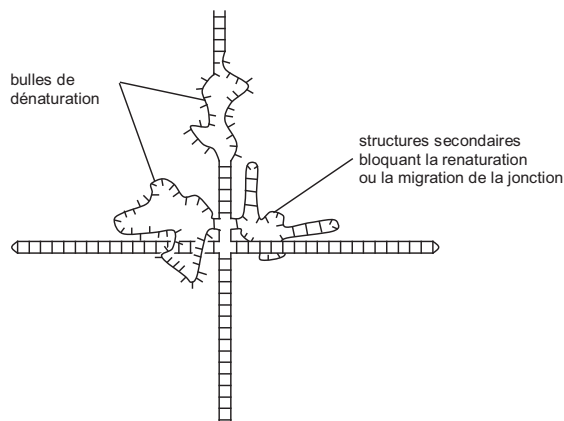


FIGURE 5.5 – *Schéma illustrant d'éventuelles structures secondaires. Les structures secondaires sont susceptibles d'apparaître au cours des cycles de baisse en force effectués pour former la jonction lorsque l'ADN est fortement sous-enroulé (figure 5.4) ou bien dans le cas où l'ADN est resté longtemps sous forme simple brin (figure 5.2). De telles structures secondaires sont susceptibles de bloquer la renaturation ou la migration de la jonction, empêchant alors la relaxation du sous-enroulement.*

5.2 Caractère cinétique de la migration en magnésium

Les résultats précédents suggèrent qu'en torsion négative, la compétition entre migration et ouverture de bulles de dénaturation est de caractère cinétique plutôt qu'énergétique. En effet, la comparaison entre les figures 5.1 et 5.2 indique qu'une attente de plusieurs minutes laisse le temps à la jonction de se former et de migrer partiellement. Pour vérifier cette hypothèse, des expériences ont été réalisées tout d'abord pour mesurer l'influence de la vitesse de sous-enroulement sur la compétition migration-dénaturation, puis pour mesurer directement la cinétique du processus de migration en magnésium.

La figure 5.6 illustre l'effet de la vitesse de sous-enroulement sur la migration de la jonction. La jonction a tout d'abord été formée (courbes noires 1, 2 et 3) et l'on s'est positionné à -400 tr, à un point de la courbe où la jonction est présente seule, sans bulles de dénaturation ni structures secondaires éventuelles. A partir de cette position de -400 tr, la molécule est sous-enroulée à différentes vitesses et son extension est enregistrée à chaque pas (courbes rouge, verte et bleue - dans l'ordre des vitesses décroissantes). Bien que les trois courbes finissent par décrocher de la droite de migration, signalant une dénaturation partielle de la molécule, le décrochement se fait d'autant plus tard que la vitesse de sous-enroulement est lente. De plus, l'inclinaison des traces s'écarte d'autant plus de la droite de migration que le sous-enroulement est rapide. A la force de 1.9 pN, l'extension de l'ADN dénaturé est identique à celle de l'ADN double brin (cf. plateau de la courbe 2). Ainsi, pendant le décrochement, l'écart entre l'extension effective de la molécule et l'extension attendue en cas de migration parfaite (droite à 3 nm/tr) quantifie la dénaturation. La quantité d'ADN dénaturé dépend donc effectivement de la vitesse avec laquelle

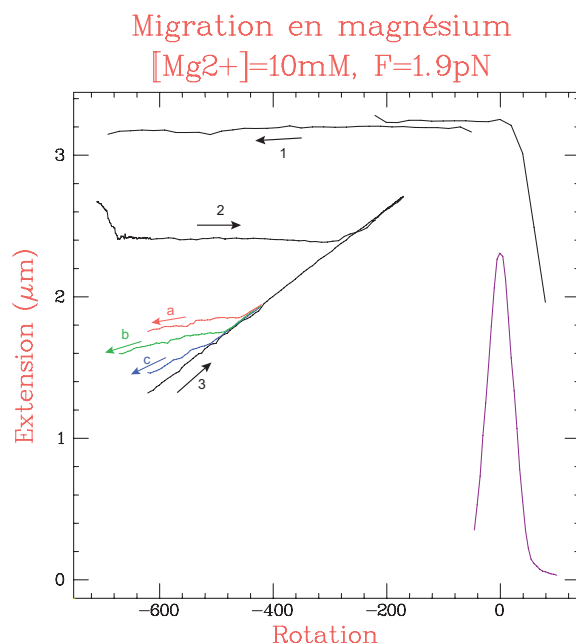


FIGURE 5.6 – *Effet de la vitesse de rotation sur la compétition migration-dénaturation en présence d'ions magnésium.* Les courbes noires illustrent le chemin suivi pour former la jonction (courbes 1 et 2), et montrent, à titre indicatif, une droite de migration obtenue au cours d'un retour (courbe 3). Les courbes rouge, verte et bleue sont des séquences de sous-enroulement partant toutes du même point (-400 tr) mais effectuées à des vitesses différentes. Plus précisément, la molécule est sous-enroulée par pas de -5 tr avec une vitesse de rotation des aimants identique pour les trois courbes (2 tr/s), mais avec des temps d'attente différents entre les pas : ~ 2 s pour la courbe rouge (a), ~ 4 s pour la verte (b) et ~ 8 s pour la bleue (c).

le sous-enroulement est effectué, tandis que la vitesse de migration, elle, est uniforme. Quantitativement, on mesure en effet ici les vitesses de raccourcissement de -0.90 , -0.65 et -0.71 nm/s, soit en moyenne -0.75 ± 0.13 nm/s. Corrigé par la valeur de l'extension relative ($\lambda = 0.89$ à 1.9 pN), on obtient donc en présence de bulles de dénaturation une vitesse de relaxation moyenne de -0.84 ± 0.15 nm/s, soit $\sim 0.23 \pm 0.04$ tr/s. Ces observations confirment l'idée d'une compétition cinétique entre migration et dénaturation.

Pour mettre en évidence de façon plus explicite l'effet du magnésium sur la cinétique de migration, l'extension de la molécule a été suivie au cours du temps lors d'un sous enroulement de -200 tr effectué à environ 1 pN, et ce en présence ou en l'absence d'ions magnésium (figure 5.7). Cette expérience illustre clairement la différence de comportement dans les deux conditions. Alors que la migration est très rapide en l'absence d'ions divalents (la molécule est immédiatement relaxée après la rotation des aimants, même à la vitesse de 2 tr/s ici imposée), en revanche, en présence de 10 mM d'ions magnésium, la migration met près de 20 min (1100 ± 100 s) à s'accomplir totalement, ce qui correspond à une vitesse de relaxation d'environ 0.18 ± 0.02 tr/s. On retrouve en ordre de grandeur l'estimation précédente de 0.23 tr/s.

Il convient néanmoins de noter qu'aux forces de 1 et 2 pN ici imposées il y a,

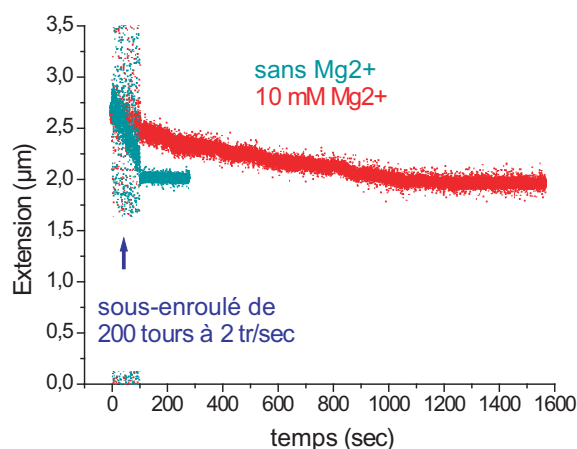


FIGURE 5.7 – *Comparaison de la cinétique de migration avec ou sans magnésium à une force de 1 pN : évolution de l'extension au cours du temps. Dans les deux cas la jonction est préformée et positionnée au même nombre de tour de sous-enroulement (donc approximativement à la même position dans la séquence), puis -200 tr à 2 tr/s sont effectués avec les aimants (cf. flèche et augmentation du bruit dû aux vibrations pendant la rotation des aimants). En l'absence de magnésium (courbe verte) la jonction migre très rapidement pendant le sous-enroulement, et dès la fin de la rotation des aimants, l'extension a diminué d'environ 600 nm, correspondant aux 200 tours d'ADN passés dans les bras horizontaux de la jonction. L'extension reste ensuite constante, correspondant au fait que la molécule est entièrement relaxée. En revanche en présence de 10 mM d'ions magnésium (courbe rouge) on constate qu'à la fin du sous-enroulement, l'extension de la molécule est encore très proche de celle de départ, indiquant que le sous-enroulement a entraîné la dénaturation de la molécule. L'extension diminue ensuite lentement pendant environ 20 min jusqu'à atteindre la même valeur qu'en l'absence de magnésium, correspondant donc à l'état relaxé.*

en sur-enroulement négatif, formation de bulles de dénaturation, et nous ne pouvons pas exclure que la présence de ces bulles puisse interférer avec la migration de la jonction, modifiant la cinétique apparente du processus.¹ Pour contourner cette difficulté, le même type d'expérience a été réalisé mais à une force plus faible de ~ 0.3 pN (figure 5.8). Dans ce cas, le couple pour former les plectonèmes devient plus faible que le couple de dénaturation (~ -9 pN \cdot nm/rad), et l'on ne peut alors plus dénaturer la molécule [209].

La mesure de la vitesse de relaxation se fait cette fois-ci en mesurant le temps entre le démarrage du sur-enroulement et la fin de la remontée en extension (voir figure 5.9). Cette méthode de mesure du temps présente plusieurs avantages par rapport à une mesure de la pente de remontée. Tout d'abord, cette pente n'est pas très bien définie car la remontée n'est pas nécessairement régulière. D'autre part, la remontée est très rapide après un sur-enroulement positif, rendant difficile la détermination d'une pente. De plus,

¹On pourrait éventuellement s'attendre à une accélération de la migration, étant donné que lorsque le point de branchement arrive au niveau d'une bulle de dénaturation, les bases sont déjà désappariées et prêtes à être échangées; la barrière énergétique associée au déplacement du point de branchement devrait donc être diminuée. Cependant, il peut aussi exister des effets de séquence qui pourraient induire un blocage de la migration (voir figure 5.3 courbe verte et figure 5.6 courbe noire où l'extension reste constante, illustrant que la jonction est bloquée malgré la présence du couple de dénaturation).

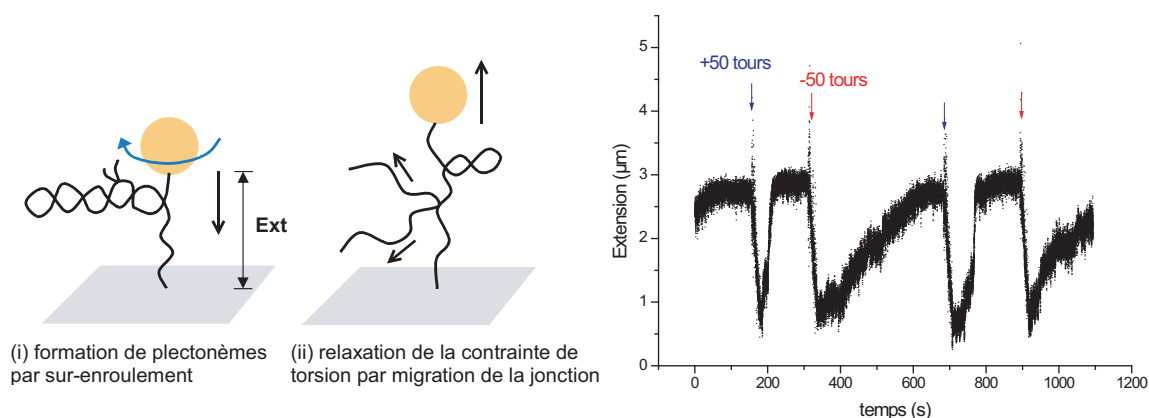


FIGURE 5.8 – **Cinétique de migration à basse force (0.3 pN) et en présence de magnésium.** (a) Schéma de la configuration. (i) L'ADN contenant une jonction de Holliday préformée est sur-enroulé positivement ou négativement à basse force, formant ainsi des plectonèmes et diminuant l'extension de la molécule. (ii) La contrainte de torsion présente dans la molécule induit alors une migration lente de la jonction, qui résorbe les plectonèmes et conduit à un rallongement de l'extension. (b) Trace de l'extension en fonction du temps. Les sur-enroulements de ± 50 tr (flèches rouges et bleues) induisent la formation de plectonèmes qui entraînent la bille au sol. Après un certain temps d'attente, pendant lequel les plectonèmes se résorbent sous l'effet de la migration de la jonction, l'extension de la molécule revient à une hauteur correspondant à l'état relaxé pour la molécule. Pendant toute la remontée, la présence de plectonèmes impose que le couple de torsion exercé sur la jonction reste égal au couple de formation des plectonèmes. La vitesse de remontée après un sur-enroulement positif est systématiquement supérieure à celle après un sur-enroulement négatif.

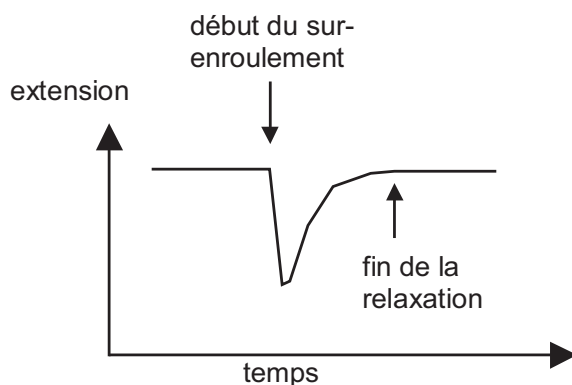


FIGURE 5.9 – **Méthode utilisée pour mesurer la vitesse de migration en présence de plectonèmes.** Un sur-enroulement positif ou négatif est introduit et l'on mesure, à partir du démarrage du sur-enroulement, le temps mis par la molécule pour atteindre à nouveau un état relaxé (identifié par la fin de la remontée).

la détermination d'une pente demanderait ensuite de convertir la variation d'extension en

une vitesse de migration, ce qui nécessiterait de prendre en compte l'extension relative de la molécule ainsi que la variation d'extension due uniquement à la résorption des plectonèmes au cours de la migration de la jonction (voir figure 5.16). La vitesse de relaxation en tours par seconde s'exprimerait alors en fonction de la vitesse de variation de l'extension selon la relation suivante :

$$\dot{\Delta n} = \frac{d\Delta n}{dt} = \left(\frac{1}{dExt/d\Delta n} \right) \frac{dExt}{dt} = \left(\frac{1}{p\lambda(F) + \alpha_P(F)} \right) \frac{dExt}{dt}$$

où p est le pas de l'ADN, et λ et α_P sont des grandeurs dépendantes de la force F et représentant respectivement l'extension relative de l'ADN et la pente de l'extension en fonction du nombre de supertours lors de la formation de plectonèmes (voir figure 5.16). Enfin, la migration peut commencer avant que les 50 tours de sur-enroulement n'aient complètement été introduits. Mesurer le temps de remontée permet de déterminer directement la vitesse moyenne, puisque l'on sait exactement le nombre de tours introduits dans la molécule ².

Les vitesses moyennes de relaxation obtenues après un sur-enroulement positif ou négatif sont respectivement de $0.13(\pm 0.04)$ tr/s et $0.53(\pm 0.16)$ tr/s, soit des vitesses de migration de $0.68(\pm 0.2)$ bp/s et $2.8(\pm 0.8)$ bp/s (les valeurs entre parenthèses correspondent à l'écart type des mesures). Il y a donc une dissymétrie dans la vitesse de migration selon que l'on a formé des plectonèmes positifs ou négatifs.

A priori, plusieurs raisons peuvent conduire à une dissymétrie de la vitesse de relaxation. Tout d'abord, la force de traction qui s'exerce sur la molécule peut favoriser la migration dans le sens d'un allongement des bras verticaux, et donc favoriser la relaxation des supertours positifs. Ensuite, la structure en double hélice droite fait de l'ADN une molécule chirale, et il se peut que la contrainte de torsion induite dans la molécule par le sur-enroulement n'ait pas la même valeur selon le sens du sur-enroulement ; néanmoins, la symétrie des courbes d'extension en fonction du sur-enroulement obtenues à basse force, ainsi que d'autres expériences en molécule unique, tendent à montrer que le module de torsion C est le même quelque soit le sens de sur-enroulement [206, 211–213]. Enfin, alors qu'en l'absence de contraintes mécaniques la jonction de Holliday en conformation ouverte a une symétrie d'ordre 4 qui rend les deux sens de migration totalement symétriques (en négligeant d'éventuels effets de séquence), en revanche le fait de tirer sur deux bras opposés de la structure introduit une brisure de symétrie ; la jonction devient alors un objet chiral, ce qui peut expliquer l'asymétrie de relaxation observée.

Avant de revenir plus en détail sur cette asymétrie et l'interprétation que l'on peut en faire, nous allons tout d'abord tenter de modéliser la cinétique du processus de migration et l'influence sur cette cinétique des contraintes mécaniques imposées.

²Une des difficultés de cette méthode est la détermination du temps de fin de relaxation, notamment en raison du mouvement brownien, important à faibles forces, et qui rend délicat le choix d'un niveau seuil comme critère de fin de migration. Pour cette raison, la mesure est effectuée de la façon suivante : la trace est prise à rebours (en partant de la zone où l'extension est constante après la fin de la remontée), le temps de la fin de la remontée est identifié par le critère suivant : c'est le premier moment en partant de la fin (et donc le dernier dans l'ordre chronologique) où il y a sans ambiguïté une baisse de la valeur de l'extension (c'est-à-dire le moment à partir duquel le signal sort significativement de l'enveloppe définie par l'amplitude du mouvement brownien lorsque l'équilibre est atteint).

5.3 Cinétique de la migration sous contraintes mécaniques

5.3.1 Quelques éléments de théorie cinétique

La migration du point de branchement comme une marche aléatoire

Le processus de migration de la jonction peut être décrit comme une marche aléatoire à une dimension [80]. Dans ce cas la position du point de branchement peut, à chaque pas, avancer ou reculer d'un cran dans la séquence. On associe à ce processus les constantes cinétiques k_+ et k_- correspondant respectivement à l'avancée ou au recul du point de branchement dans la séquence (voir figure 5.10). En l'absence de contraintes extérieures, et en négligeant les éventuels effets de séquence, l'avancée est équiprobable au recul, et l'on a $k_+ = k_- = k_0$ (figure 5.10-a), où k_0 s'exprime, selon la théorie de l'état de transition³ [217, 218] :

$$k_0 = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / k_B T} \quad (5.1)$$

où h est la constante de Planck et ΔG^\ddagger est l'énergie libre de l'état de transition qui s'exprime en fonction de l'enthalpie libre ΔH^\ddagger et de l'entropie ΔS^\ddagger :

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger.$$

On obtient alors pour k_0 l'équation d'Eyring⁴ :

$$k_0 = \frac{k_B T}{h} e^{\Delta S^\ddagger / k_B} \cdot e^{-\Delta H^\ddagger / k_B T} \quad (\text{équation d'Eyring}) \quad (5.3)$$

En présence d'une contrainte extérieure (comme une force F ou un couple Γ), un sens de migration est favorisé par rapport à l'autre (figure 5.10-b). Une manière simple de représenter l'effet d'une contrainte est de considérer que celle-ci introduit un gradient

³L'approche plus globalement admise pour la détermination des taux de transition est en fait la théorie de Kramers [214–216] qui montre en particulier que le taux de transition est fonction de la forme globale du potentiel énergétique. En outre, elle montre aussi que la Théorie de l'Etat de Transition surestime le taux de transition. Dans toute la suite de ce chapitre, on supposera que les contraintes mécaniques ont un effet seulement sur la hauteur relative des extrema du potentiel mais pas sur la courbure du potentiel à ces extrema.

⁴On aurait également pu exprimer k_0 selon la loi d'Arrhenius :

$$k_0 = A e^{-E_a / k_B T} \quad (\text{loi d'Arrhenius}) \quad (5.2)$$

où A est le facteur pré-exponentiel et E_a est l'énergie d'activation. La comparaison entre les relations (5.3) et (5.2) se fait en remarquant que

$$\frac{d \ln(k_0)}{d(1/T)} = -\frac{E_a}{k_B} = -T - \frac{\Delta H^\ddagger}{k_B}$$

soit

$$E_a = \Delta H^\ddagger + k_B T$$

et donc

$$A = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{\left(\frac{\Delta S^\ddagger + k_B}{k_B}\right)}.$$

La loi d'Arrhenius est une bonne approximation lorsque A et E_a dépendent peu de T .

d'énergie potentielle qui se superpose aux variations périodiques du paysage énergétique (figure 5.10-b). On obtient alors :

$$k_{\pm} = k_0 e^{\pm \Delta \Delta G^{\ddagger} / k_B T} \quad (5.4)$$

où $\Delta \Delta G^{\ddagger}$ est la variation du niveau d'énergie de l'état de transition et s'exprime en fonction des contraintes mécaniques :

$$\Delta \Delta G^{\ddagger} = Fd \quad \text{ou} \quad \Delta \Delta G^{\ddagger} = \Gamma r$$

avec d et r représentant respectivement une distance et un angle caractéristiques associés à l'effet de la contrainte de force F ou du couple Γ sur la cinétique du processus. Une conséquence essentielle de la présence du gradient d'énergie provoqué par la contrainte est le changement relatif des niveaux d'énergie entre l'état intermédiaire associé au saut dans le sens positif et l'état intermédiaire associé au saut dans le sens négatif, changement qui définit alors un sens de migration préférentiel.

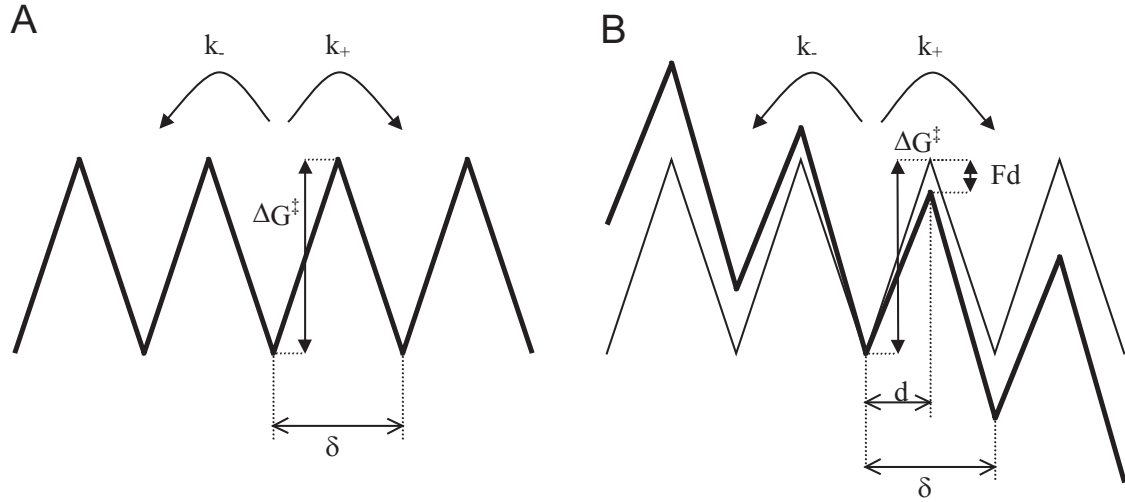


FIGURE 5.10 – **Diagramme énergétique pour une marche aléatoire** A) En l'absence de contraintes extérieures, le mouvement du point de branchement peut se faire en avant ou en arrière de façon équiprobable ($k_+ = k_- = k_0$, avec $k_0 = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^{\ddagger} / k_B T}$ et dépend donc de l'énergie de l'état de transition ΔG^{\ddagger}). La distance entre deux positions successives est notée δ . B) La présence d'une contrainte, comme un couple ou ici une force de traction, induit un gradient d'énergie potentielle et une différence $F\delta$ d'énergie entre deux sites successifs. De plus la contrainte entraîne qu'un sens de migration devient plus favorable que l'autre (ici $k_{\pm} = k_0 e^{\pm \Delta \Delta G^{\ddagger} / k_B T}$ (équation (5.4)) soit $k_+ = k_0 e^{Fd / k_B T} > k_- = k_0 e^{-Fd / k_B T}$, où d est une distance caractéristique associée à l'effet de la contrainte de force F sur la cinétique du processus de migration). Le paramètre d représente ici la distance entre le minimum local d'énergie et le maximum de la barrière, mais cette signification géométrique n'est pas nécessairement valable (voir texte).

La signification physique du paramètre d (ou r) n'est pas évidente. On peut tout d'abord l'interpréter comme la distance entre la position du minimum d'énergie et celle

du maximum à franchir pour atteindre le minimum suivant (c'est à dire la distance à la barrière énergétique à franchir pour passer d'un site à l'autre). Dans ce cas, l'inclinaison représentée figure 5.10-b représente directement l'effet de la contrainte sur le niveau de la barrière d'énergie, et cet effet est alors équivalent à celui qui produit l'écart $F\delta$ d'énergie potentielle entre deux minima successifs. Cette interprétation est valable si $d < \delta$. Dans le cas où d est supérieur à δ , l'interprétation géométrique précédente ne peut plus tenir. On peut alors se représenter d comme une distance caractéristique associée à un changement de conformation lié au mouvement.

Les constantes cinétiques k_+ et k_- permettent de définir le temps moyen τ pour effectuer un pas, ainsi que la vitesse V du processus de migration [219] :

$$\tau = \frac{1}{k_+ + k_-} \quad (5.5)$$

$$V = \delta(k_+ - k_-), \quad (5.6)$$

ce qui donne avec la relation (5.4) :

$$V = 2\delta k_0 \cdot \sinh\left(\frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{k_B T}\right). \quad (5.7)$$

Dans le cas où il n'y a pas de sens préférentiel ($\Delta\Delta G^\ddagger = 0$) $k_+ = k_- = k_0$ et $V = 0$: il y a "diffusion" du point de branchement, mais sa position moyenne reste fixe.

La migration du point de branchement comme processus de diffusion

La description "microscopique" que nous venons de détailler pour la migration de la jonction peut être mise en relation avec une description "macroscopique" où l'on considère que le mouvement du point de branchement obéit à une loi de diffusion. En effet, les deux grandeurs que nous avons introduites, qui sont la longueur δ du pas élémentaire et le temps caractéristique τ , permettent de définir un coefficient de diffusion [220] :

$$D = \frac{\delta^2}{2\tau}.$$

Ce coefficient de diffusion peut être relié à un coefficient de friction par la relation d'Einstein :

$$\alpha = \frac{k_B T}{D}.$$

Si nous faisons l'hypothèse d'une contrainte de force (pour prendre un exemple concret), nous obtenons pour l'équation de diffusion :

$$m \frac{dV}{dt} = -\alpha V + F$$

ce qui donne à l'état stationnaire ($dV/dt = 0$) :

$$V = \frac{F}{\alpha} = \frac{FD}{k_B T} = \frac{F}{k_B T} \delta^2 k_0 \cdot \cosh\left(\frac{Fd}{k_B T}\right). \quad (5.8)$$

L'expression (5.8) trouvée ici pour la vitesse diffère de la relation (5.7) calculée par la méthode précédente ($\Delta\Delta G^\ddagger$ correspondant ici à Fd). Cependant, si l'on effectue un développement limité au premier ordre en $\Delta\Delta G^\ddagger/k_B T = Fd/k_B T$, on obtient dans le cas du modèle de diffusion :

$$V = \frac{F}{k_B T} \delta^2 k_0 \quad (5.9)$$

et dans le modèle de marche aléatoire :

$$V = \frac{F}{k_B T} 2d\delta k_0 \quad (5.10)$$

On constate alors qu'au premier ordre, les deux expressions sont équivalentes si l'on pose $2d = \delta$. On est donc dans une situation équivalente au cas où la barrière énergétique est exactement à mi-distance entre deux minima et la force F a simplement pour effet de créer un gradient de potentiel. De plus le fait de calculer le développement limité de V au premier ordre en $\Delta\Delta G^\ddagger/k_B T$ signifie que la variation énergétique $\Delta\Delta G^\ddagger$ induite par la force sur la barrière est très petite devant l'énergie thermique $k_B T$. C'est donc principalement cette dernière qui guide le processus ; en d'autres termes, si $\Delta\Delta G^\ddagger$ est très petit devant $k_B T$, le processus est principalement diffusif avec une faible dérive globale à la vitesse V , très faible par rapport à la vitesse δ/τ de passage d'un site à l'autre.

Ce paragraphe sur "la migration du point de branchement comme processus de diffusion" n'était qu'une parenthèse pour illustrer comment, sous certaines conditions, on peut faire l'analogie entre marche aléatoire et processus de diffusion. Néanmoins, pour s'astreindre de toute restriction de validité, nous utiliserons l'expression (5.7) obtenue en raisonnant dans le cadre d'une marche aléatoire, cadre le mieux adapté pour décrire le processus de migration de la jonction de Holliday.

5.3.2 Cinétique de migration sous force seule

Les résultats décrits dans cette sous-partie ont été obtenus grâce à un heureux hasard que nous avons ensuite exploité : au cours d'une expérience de migration de la jonction en magnésium une rupture partielle des attachements a fait perdre à la molécule d'ADN son caractère sur-enroulable alors que la jonction avait été formée et que le point de branchement était situé en milieu de séquence. De ce fait, nous avons pu observer la migration de la jonction sous l'effet de la seule force de traction exercée sur la molécule (absence de contraintes de torsion).

Le résultat de cette expérience est représenté figure 5.11-a où l'on a tracé l'évolution de l'extension de la molécule au cours du temps. La variation d'extension dépend clairement du niveau de force qui est ici changé de façon séquentielle. Les vitesses de migration sont déterminées à partir des mesures de la variation de l'extension au cours du temps ($\Delta Ext/\Delta t \simeq 0$ nm/s à 0.75 pN, $\simeq 0.87$ nm/s à 1.95 pN et $\simeq 1.95 \pm 0.2$ nm/s à 2.7 pN), corrigées de la valeur de l'extension relative à chaque niveau de force (0.894 à 1.95 pN et 0.91 à 2.7 pN). On obtient respectivement pour les vitesses : 0 nm/s, 0.97 nm/s et 2.14 ± 0.3 nm/s.

Application du modèle de la marche aléatoire

La vitesse de migration en fonction de la force de traction est représentée figure 5.11-b (points noirs). En ajustant l'effet de la force par l'expression (5.4) en posant

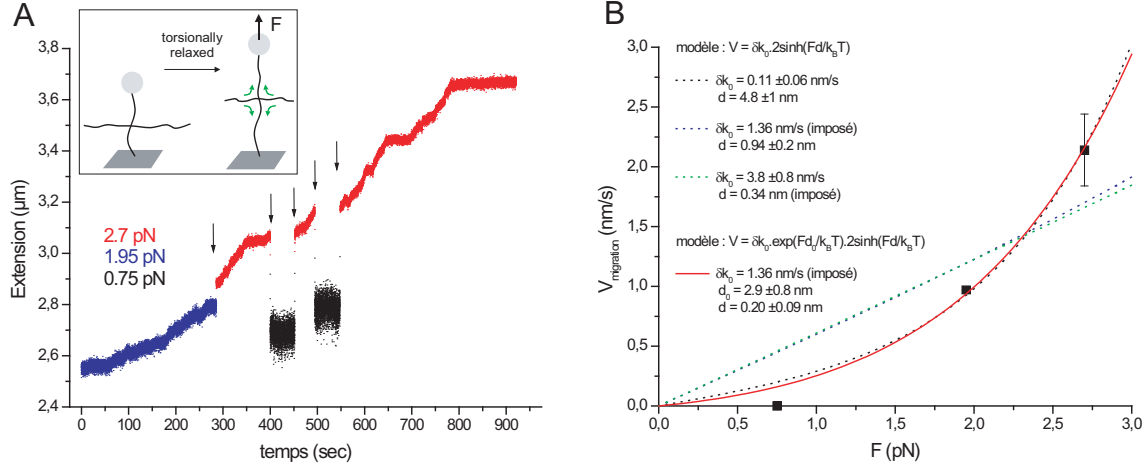


FIGURE 5.11 – *Migration de la jonction sous force seule, sans torsion.* (A) *Extension en fonction du temps d'une jonction de Holliday. Les flèches indiquent les moments où la force a été changée. Bleu : 1.95 pN, noir : 0.75 pN, rouge : 2.7 pN. (Encart : Configuration expérimentale : après formation de la jonction, un décrochement partiel des ancrages multiples relâche la contrainte de torsion de la molécule ce qui permet à la jonction de migrer sous l'effet de la seule force de traction).* (B) *Vitesse de migration en fonction de la force de traction, estimée en mesurant le rapport $\Delta Ext/\Delta t$ pour chaque section du tracé en (A). La barre d'erreur à 2.7 pN représente la dispersion des trois mesures obtenues à cette force. Plusieurs ajustement (lignes en pointillés et ligne continue rouge) ont été effectués selon deux modèles distincts (voir texte).*

$\Delta\Delta G^\ddagger = Fd$ (courbe en pointillés noire) on obtient pour la distance caractéristique :

$$d = 4.8 \pm 1 \text{ nm}$$

et pour le pré-facteur :

$$\delta k_0 = 0.11 \pm 0.06 \text{ nm/s.}$$

Avant de discuter ces résultats, voyons à quelles valeurs on aurait pu s'attendre. Dans l'hypothèse d'une seule paire de bases échangée à chaque pas, on aurait $\delta = 0.68 \text{ nm}$, ce qui donnerait, avec $k_0 \simeq 2 \text{ s}^{-1}$ déterminé par ailleurs [80,83]⁵, $\delta k_0 = 1.36 \text{ nm/s}$. D'autre part, dans le cas simple où d représenterait la distance à la barrière, située exactement entre deux minima, on obtiendrait $d = \delta/2 = 0.34 \text{ nm}$. Les résultats obtenus par l'ajustement diffèrent donc nettement de ceux auxquels on se serait attendu dans le cas le plus simple.

Pour vérifier la pertinence des paramètres d et δk_0 obtenus, l'ajustement a été fait en imposant soit $\delta k_0 = 1.36 \text{ nm/s}$ (courbe en pointillés bleue), soit la valeur $d = 0.34 \text{ nm}$ (courbe en pointillés verte). Dans les deux cas l'ajustement est très mauvais et ne parvient pas à décrire la courbure suggérée par les résultats expérimentaux.

⁵Panyutin & Hsieh [80] ont trouvé un temps caractéristique d'environ $\sim 0.3 \text{ s}$, ce qui donne avec la relation (5.5) la valeur $k_0 \simeq 2 \text{ s}^{-1}$. Mulrooney *et al.* [83] ont quant à eux trouvé la valeur $k \simeq 4 \text{ s}^{-1}$, cependant ils ont pris comme définition $k = 1/\tau$ au lieu de la relation (5.5); ils trouvent donc approximativement le même temps caractéristique que Panyutin et Hsieh, et donc la même valeur pour k_0 .

Discussion des résultats et comparaison avec d'autres expériences

Concernant la distance caractéristique d , celle-ci est très supérieure à la valeur de 0.34 nm attendue dans le cas le plus simple. On peut interpréter cet écart comme dénotant le fort caractère entropique du processus. Il faut néanmoins noter que dans ce cas, et dans le cadre de notre modèle, le caractère entropique dont il est ici question ne doit pas être rattaché au passage de la conformation empilée à la conformation ouverte. En effet ce changement de conformation est une étape obligée, quelque soit le sens de migration, or le paramètre d est associé ici à une étape qui est favorisée ou défavorisée selon le sens dans lequel la contrainte s'exerce. Il faut donc associer cette distance d à l'échange des paires de bases proprement dit (c'est à dire à la rupture puis au réappariement de deux paires de bases au niveau du point de branchement). A ce stade, il est donc difficile de conclure plus précisément sur l'origine de la valeur du paramètre d .

Concernant le pré-facteur δk_0 , la valeur 0.11 nm/s obtenue par l'ajustement est au moins un ordre de grandeur en dessous de la valeur 1.36 nm/s attendue dans l'hypothèse d'une seule paire de bases échangée à chaque pas. Etant donné que la valeur 0.68 nm est un minimum pour le paramètre δ (il pourrait éventuellement s'échanger plus d'une paire de bases à chaque pas, mais il ne peut pas s'en échanger moins!), il faut donc nécessairement réajuster au moins le paramètre k_0 . Or la valeur de $\sim 2 \text{ s}^{-1}$ a été obtenue par Panyutin & Hsieh [80] ou Mulrooney *et al.* [83] dans l'hypothèse d'une seule paire de bases échangée par pas ; notons donc cette valeur k_0^1 et voyons ce que l'on obtiendrait en levant l'hypothèse sur la taille du pas.

On peut supposer par exemple qu'en moyenne q paires de bases sont échangées par pas, on obtient alors la constante cinétique k_0^q , reliée à $k_0^1 = 2 \text{ s}^{-1}$ par la relation [83] :

$$k_0^q = \frac{k_0^1}{q^2}. \quad (5.11)$$

En posant

$$k_0 = k_0^q \quad \text{et} \quad \delta = \delta^q = q\delta^1$$

on obtient

$$\delta k_0 = \delta^q k_0^q = q\delta^1 \frac{k_0^1}{q^2} = 0.11 \text{ nm/s}$$

soit

$$q = \frac{k_0^1 \delta^1}{0.11} = \frac{2 \times 0.68}{0.11} = 12 \text{ bp.}$$

Cette valeur n'est cependant pas compatible avec la contrainte d'un pas de l'ordre d'une paire de bases, contrainte résultante du fait qu'en présence de magnésium, une seule paire de bases mésappariée est un obstacle important à la migration de la jonction de Holliday (voir chapitre 1).

Finalement, le modèle présenté jusqu'ici est peu satisfaisant car les résultats obtenus pour les paramètres d et δk_0 ne sont compatibles ni avec les résultats des mesures cinétiques obtenues par ailleurs, ni avec le mécanisme généralement accepté pour décrire le processus de migration. Nous devons donc en conclure que le modèle cinétique proposé ici pour décrire l'effet de la contrainte de force est erroné ou trop simpliste.

Affinement du modèle cinétique

Les études cinétiques du processus de migration et les études structurales de la jonction de Holliday indiquent que pour échanger une paire de bases, la jonction doit passer par une conformation ouverte (voir le paragraphe 1.6.3 en introduction). Cette contrainte sur la conformation se traduit par une faible efficacité de migration par diffusion. La barrière cinétique est donc dans ce cas essentiellement entropique plutôt qu'énergétique.

Un effet que nous n'avons jusqu'à présent pas pris en compte est la possibilité que, dans notre configuration, le fait de tirer sur deux bras opposés de la jonction, puisse influencer sur la stabilité relative entre la conformation ouverte et la conformation empilée, modifiant ainsi le taux d'occupation de la conformation ouverte et donc la cinétique du processus de migration. La force agirait alors non seulement sur la variation relative $\Delta\Delta G^\ddagger$ de la barrière d'énergie, mais aussi sur le terme k_0 lui-même, c'est-à-dire sur le niveau moyen ΔG^\ddagger de l'état de transition (figure 5.12). Les expériences de Mulrooney *et al.* [83] ont permis de déterminer les valeurs $\Delta H^\ddagger = 55.8 \text{ k}_B\text{T}$ et $\Delta S^\ddagger = 29.4 \text{ k}_B$, soit une valeur de $\Delta G^\ddagger = 26.4 \text{ k}_B\text{T}$ (à $T = 37^\circ\text{C}$).⁶ Une variation de seulement 10% sur la valeur de ΔG^\ddagger suffirait à varier d'un facteur 10 la valeur de k_0 obtenue.

On peut donc envisager deux effets séparés et indépendants de la force : d'une part un effet sur la hauteur relative des barrières énergétiques associées à l'avancée ou au recul (gradient d'énergie potentielle), et d'autre part une modification globale de la hauteur moyenne de la barrière énergétique (voir figure 5.12). Dès lors, nous pouvons ré-expliciter les expressions de k_+ et k_- :

$$k_{\pm} = k_0(F) \cdot e^{\frac{\pm Fd}{k_B T}} = k_0(0) e^{\frac{F d_0}{k_B T}} \cdot e^{\frac{\pm Fd}{k_B T}}. \quad (5.12)$$

Dans cette expression, le premier terme exponentiel est associé à l'effet de la force sur la hauteur moyenne de la barrière et le paramètre d_0 est une distance caractéristique associée à cet effet. Le signe de d_0 doit alors traduire si cet effet de la force augmente ou diminue globalement la hauteur de la barrière, et donc si la force favorise ou défavorise globalement la migration. Le second terme exponentiel traduit l'apparition d'un décalage de $2 \cdot \Delta\Delta G^\ddagger = 2 \cdot Fd$ entre la hauteur de barrière pour l'avancée et celle pour le recul. Le paramètre d joue donc ici le même rôle qu'auparavant. On a alors pour la vitesse l'expression suivante :

$$V = \delta \cdot k_0(0) e^{\frac{F d_0}{k_B T}} \cdot 2 \sinh\left(\frac{Fd}{k_B T}\right) \quad (5.13)$$

En ajustant les mesures de la figure 5.11-b par l'expression (5.13), et en imposant les valeurs $\delta = 0.68 \text{ nm}$ et $k_0 = 2 \text{ s}^{-1}$ on obtient un ajustement satisfaisant avec les résultats suivants : $d_0 = 2.9 \pm 0.8 \text{ nm}$ et $d = 0.2 \pm 0.09 \text{ nm}$.

On constate tout d'abord que le signe de d_0 est positif, et donc, contrairement au cas du modèle précédent, la force induit ici une diminution de la hauteur moyenne de la barrière énergétique. Cet effet indique que la tension favorise la conformation ouverte de la jonction. On peut interpréter aisément ce résultat au vu de la géométrie du système (voir figure 5.13) : l'application d'une tension sur deux bras opposés de la jonction de Holliday favorise le dépliage de la structure. La conformation empilée étant un intermédiaire nécessaire à l'échange des paires de bases, la cinétique est globalement améliorée par l'application de la force. Quant à la valeur trouvée pour d_0 (2.9 nm), bien que difficilement interprétable géométriquement, elle reste néanmoins compatible avec une échelle

⁶On peut aussi partir de la relation (5.1) avec $k_0 = 2 \text{ s}^{-1}$. On trouve alors $\Delta G^\ddagger = 28.2 \text{ k}_B\text{T}$.



FIGURE 5.12 – *Effet de la contrainte de force sur le niveau moyen de l'état de transition.* En plus du gradient de potentiel qui définit un sens de migration préférentiel, la contrainte de force peut entraîner une variation du niveau moyen global de la barrière d'énergie à franchir au cours de la migration. On a fait le choix, a priori arbitraire, de représenter ici une baisse du niveau d'énergie de l'état de transition. Le paramètre d_0 est une distance caractéristique associée à l'effet de la contrainte de force.

de dimension à laquelle se ferait le changement de conformation associé au dépliement de la jonction.

La valeur de 0.2 nm trouvée pour d est également compatible avec la taille d'un pas pour l'échange d'une paire de bases ($\delta = 0.68$ nm). On obtient en effet $d < \delta/2$ compatible avec une interprétation géométrique simple où d est la distance entre le minimum d'énergie et la barrière énergétique.

Le modèle cinétique amélioré, décrit par l'équation (5.13), est finalement satisfaisant sur plusieurs points. Tout d'abord il s'ajuste aussi bien que le précédent aux résultats expérimentaux sans introduire de variable d'ajustement supplémentaire. De plus il est compatible avec les valeurs connues pour les paramètres δ et k_0 . Enfin les valeurs obtenues pour les distances caractéristiques d et d_0 sont compatibles avec le mécanisme communément admis pour le processus de migration en magnésium [49, 83]. Nous pouvons donc en conclure que l'équation (5.13) est une description vraisemblable de l'effet d'une contrainte mécanique sur le processus de migration.

5.3.3 Cinétique de migration sous force et couple : asymétrie de la cinétique

Au paragraphe 5.2 nous avons observé une dissymétrie de la cinétique de migration de la jonction : la vitesse de migration est plus rapide lorsque la contrainte de torsion imposée est positive (correspondant à un sur-enroulement de la molécule). Dans ce cas, la migration va dans le sens d'un allongement des bras verticaux, et l'on peut s'attendre à ce que la force de traction qui s'exerce sur la molécule favorise la migration dans ce sens, mais s'y oppose lorsque il s'agit de relâcher les supertours négatifs. La dissymétrie pourrait donc tout d'abord provenir d'une effet de la force de traction exercée sur la molécule.

Cependant, il faut aussi tenir compte dans ces expériences de la présence d'une contrainte de torsion. Or, comme nous l'avons vu précédemment, en raison de l'hélicité

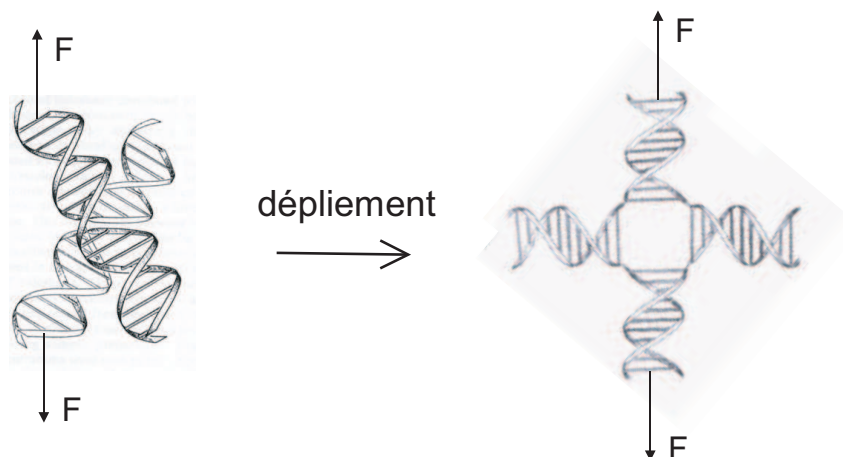


FIGURE 5.13 – *Effet de la force sur la conformation de la jonction de Holliday.* En présence de magnésium, la jonction de Holliday est en conformation empilée avec les bras faisant entre eux un angle d'environ 60° . L'application d'une force de traction sur deux bras opposés génère une contrainte sur les bras qui a pour effet de déplier la structure, stabilisant ainsi la conformation ouverte.

droite de la double hélice d'ADN, la jonction de Holliday devient chirale sous l'effet de la brisure de symétrie induite par la tension qui s'exerce sur deux bras opposés. Il n'y a donc pas de raison a priori pour qu'une contrainte de torsion ait le même effet suivant qu'elle s'exerce dans un sens ou dans l'autre. Il faut donc éventuellement tenir compte de l'effet de cette chiralité vis-à-vis de la réponse à un couple.

Pour analyser ces effets et pouvoir distinguer entre l'influence de la force et celle du couple, les mêmes expériences que celles réalisées précédemment (cinétique de migration de la jonction sous couple, voir paragraphe 5.2) ont été répétées à différents niveaux de force. Les mesures obtenues, ainsi que l'ensemble des résultats précédents, sont reportés dans le tableau 5.1 et représentés figure 5.14. Les force et vitesses négatives correspondent aux cas où un couple de torsion négatif est exercé ; la migration se fait alors dans le sens d'un raccourcissement des bras verticaux, et la force s'oppose donc à ce mouvement. Les points noirs correspondent aux points obtenus à basse force, et donc en présence de plectonèmes. Les points bleus correspondent aux mesures obtenues à plus haute force, et donc avec formation de bulles de dénaturation.

Une exploration des niveaux de force sur une gamme plus large est délicate. Tout d'abord à plus basse force, la diminution de l'extension, qui rapproche la bille de la surface du capillaire, associée à l'augmentation du mouvement brownien de la bille ainsi qu'à une baisse d'efficacité dans l'entraînement en rotation de la bille par les aimants, rendent les mesures difficiles. A plus haute force, l'augmentation du couple qui peut s'exercer sur la molécule en sur-enroulement positif entraîne une migration très rapide, rendant difficile une mesure du temps de relaxation. L'exploration en gamme de force aurait éventuellement pu être prolongée pour les sous-enroulement, là où la dénaturation assure l'existence d'un couple de torsion limite.

force (pN)	contrainte en torsion ?	vitesse
0.43	oui	-0.455 ± 0.157 nm/s
		$+2.77 \pm 0.51$ nm/s
0.3		-0.483 ± 0.091 nm/s
		$+1.89 \pm 0.60$ nm/s
0.26		-0.501 ± 0.19 nm/s
	(dénaturation)	$+2.51 \pm 0.60$ nm/s
1		-0.655 ± 0.60 nm/s
2		-0.84 ± 0.15 tr/s
0.75	non	0 nm/s
1.95		0.97 nm/s
2.7		2.14 ± 0.3 nm/s

TABLE 5.1 – **Bilan des mesures cinétiques** : vitesses de migration de la jonction de Holliday en présence d’ions magnésium en fonction de la force de traction exercée sur la molécule. Dans les expériences où la molécule est contrainte en torsion (partie haute du tableau), la vitesse de relaxation est d’abord obtenue en tours par seconde (tr/s) à partir de la connaissance du nombre total de tours effectués et à partir de la mesure du temps de relaxation obtenu soit selon la méthode décrite figure 5.9 s’il y a formation de plectonèmes, soit en mesurant le temps de retour à l’équilibre s’il y a dénaturation (voir figure 5.7). La vitesse en nanomètres par seconde (nm/s) est ensuite déduite en multipliant la vitesse de relaxation, précédemment déterminée en tours par seconde, par le pas d’hélice de l’ADN : 3.6 nm/tr. Le résultat représente donc la vitesse de variation de la longueur curviligne totale pour l’ensemble des deux bras verticaux de la molécule.

Avant d’aller plus loin dans l’analyse, faisons quelques remarques. Tout d’abord, les mesures confirment le comportement dissymétrique de la cinétique de migration vis-à-vis de la contrainte de force (voir figure 5.14). De plus, les mesures obtenues dans les cas de sous-enroulement (force s’opposant à la migration de la jonction) montrent qu’une augmentation de la force entraîne en fait une légère augmentation de la vitesse de migration (en valeur absolue). Cet effet, qui peut paraître *a priori* illogique est en fait compatible avec le résultat précédent qui suggère que la contrainte de force stabilise la conformation ouverte de la jonction, favorisant globalement la cinétique de migration. Il est également compatible avec la note de bas de page 1 (page 87) sur l’influence des bulles de dénaturation sur la cinétique de migration.

Concernant la relaxation des supertours positifs ($F > 0$), on observe une cinétique rapide ($2 \sim 3$ nm/s soit environ $0.5 \sim 1$ tr/s). Il en résulte tout d’abord une importante incertitude sur les mesures de cinétique (grandes barres d’erreur). De plus, cette vitesse n’est pas négligeable par rapport à la vitesse avec laquelle la molécule est sur-enroulée (2 tr/s), et on observe alors par exemple à $+0.43$ pN que la bille n’a pas atteint un niveau aussi bas à la fin d’un sur-enroulement positif qu’à la fin d’un sur-enroulement négatif (voir figure 5.15). Cet effet indique qu’une partie substantielle des supertours positifs a déjà été relaxée avant la fin de la rotation des aimants. Il est donc possible que la vitesse de relaxation soit en fait limitée par la vitesse de rotation des aimants. Cette limite de la

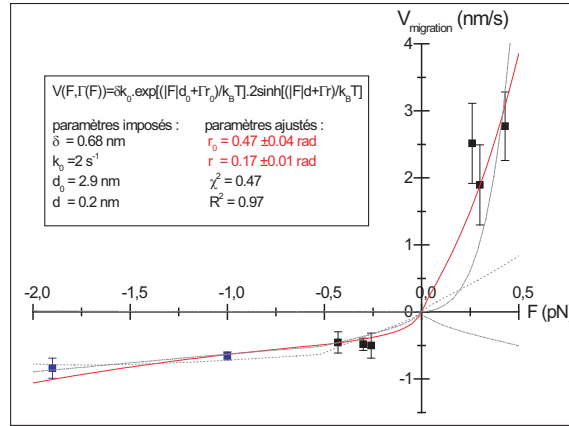


FIGURE 5.14 – *Vitesses de migration de la jonction sous torsion en fonction de la force.* Les forces négatives (respectivement positives) correspondent à un sur-enroulement négatif (respectivement positif), et donc à une force qui s'oppose (respectivement qui aide) à la migration. Les points noirs correspondent aux expériences faites à basse force et donc en présence de plectonèmes, les points bleus correspondent aux mesures faites aux niveaux de force où l'on dénature la molécule lorsqu'on la sous-enroule. La courbe rouge est un ajustement des points expérimentaux à l'aide du modèle décrit dans l'encart (voir texte, équation (5.18)) et où les paramètres r_0 et r ont été laissés libres et les paramètres δ , k_0 , d_0 et d ont été imposés aux valeurs trouvées précédemment. Les courbes pointillées grises correspondent à des ajustements effectués en prenant la valeur absolue de Γ dans le terme exponentiel et/ou dans le terme sinus-hyperbolique.

vitesses de sur-enroulement peut au final induire un effet de seuil sur les vitesses de relaxation mesurées, ce qui pourrait expliquer la faible variation des cinétiques de relaxation observées dans le cas des sur-enroulements positifs (figure 5.15, $F > 0$). Si c'est le cas, les vitesses de relaxation mesurées sont sous-estimées, et l'on obtient alors seulement une borne inférieure pour la cinétique.

5.3.4 Mise en équation de l'influence des contraintes de torsion sur la cinétique de migration

Nous allons essayer d'interpréter les résultats obtenus figure 5.14. Pour cela, nous partons de la relation (5.13) précédente qui avait permis de décrire correctement la cinétique de migration en l'absence de couple. Il faut maintenant incorporer à ce modèle les effets de la contrainte de torsion Γ , et la première étape consiste tout d'abord à évaluer la valeur de cette contrainte.

Estimation du couple $\Gamma(F)$

La formation de plectonèmes engendre tout d'abord un couple Γ_P . Ce couple dépend essentiellement de la force et s'exprime en fonction du module de torsion effectif C_{eff} de l'ADN, de la longueur l de la molécule, ainsi que du nombre de tours Δn_P à partir

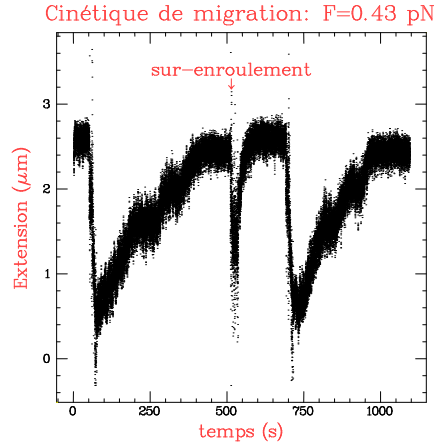


FIGURE 5.15 – *Mesures cinétiques à 0.43 pN. Extension en fonction du temps. Des sur-enroulements de ± 50 tr sont effectués à 0.43 pN. La flèche rouge indique un sur-enroulement positif : on constate en particulier que la bille n’a pas le temps d’atteindre un niveau aussi bas qu’après un sur-enroulement négatif en raison de la rapidité à laquelle la relaxation s’effectue à ce niveau de force. On constate la présence de points d’arrêt à des hauteurs similaires sur les deux remontées lentes. Ces points d’arrêt signent probablement l’existence d’effets de séquence. Cependant, lorsque nous avons cherché à mettre en évidence ces effets de séquence, nous ne sommes pas parvenus à les observer de façon systématique.*

duquel les plectonèmes commencent à se former [210, 221] (figure 5.16-a) :

$$\Gamma_P(F) = \frac{2\pi\Delta n_P(F) \cdot C_{eff}(F)}{l}. \quad (5.14)$$

Le module de torsion C_{eff} qui intervient dans cette expression diffère du module de torsion C de l’ADN car ce dernier n’est valable que pour une molécule parfaitement tendue. A basse force, comme c’est le cas ici, l’ADN est partiellement relâché, et sa résistance à la torsion est diminuée. Le module de torsion effectif C_{eff} dépend finalement du module de torsion C de l’ADN, de la force F et du module élastique de courbure B selon la relation [212] :

$$\frac{1}{C_{eff}} = \frac{1}{C} + \frac{k_B T}{4B\sqrt{BF}} \quad (5.15)$$

avec $k_B T = 4.28$ pN · nm, $C \simeq 390$ pN · nm²/rad² et $B \simeq 200$ pN · nm² [212, 221–223].

Par ailleurs, le nombre de tours $\Delta n_P(F)$ nécessaire pour former les plectonèmes est proportionnel à la racine carrée de la force (voir figure 5.16-b) [222] et les mesures expérimentales donnent :

$$\Delta n_P(F) \simeq \pm \sqrt{338 \cdot F}, \quad (5.16)$$

où le signe dépend du sens de sur-enroulement.⁷

⁷Une autre façon d’expliquer la dissymétrie de la cinétique de migration aurait été de supposer une dissymétrie dans le couple nécessaire pour former les plectonèmes. Cependant, on observe une très bonne symétrie des courbes d’extension en fonction du sur-enroulement lorsque celles-ci sont faites à basses

En prenant par exemple $F = 0.5$ pN on obtient :

$$C_{eff} \simeq 323 \text{ pN} \cdot \text{nm}^2/\text{rad}^2,$$

$$\Delta n_P = -\sqrt{338 \times 0.5} = 13 \text{ tr}$$

soit, avec $l \simeq 3000$ nm :

$$\Gamma_P \simeq 8.8 \text{ pN} \cdot \text{nm}/\text{rad}.$$

On vérifie bien qu'en deçà de 0.5 pN le couple Γ_P dans la molécule est effectivement inférieur, en valeur absolue, à la valeur du couple de dénaturation $\Gamma_d = -9$ pN · nm/rad [210, 211].

Finalement, la relation (5.14) avec les égalités (5.16) et (5.15) est valable tant que le couple reste supérieur (en valeur algébrique) au couple de dénaturation. On peut donc écrire :

$$\Gamma(F) = \max\{-9, \Gamma_P(F)\}. \quad (5.17)$$

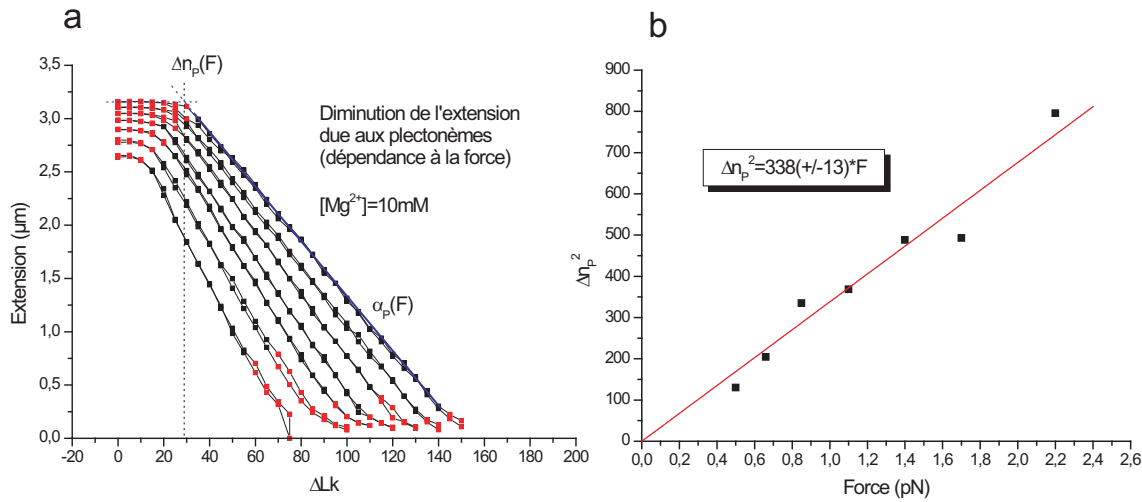


FIGURE 5.16 – **Formation des plectonèmes positifs à différents niveaux de force.** (a) Extension en fonction du nombre de tours ΔLk . $\alpha_P(F)$: pente due à la formation des plectonèmes. $\Delta n_P(F)$: valeur de sur-enroulement correspondant au début de formation des plectonèmes. (b) Relation entre la force et le nombre de tours Δn_P nécessaires pour commencer à former les plectonèmes et définis par l'intersection entre la droite due aux plectonèmes (ajustée sur les points noirs en (a)) et la valeur de l'extension à $\Delta Lk = 0$ tr). Ligne rouge : ajustement donnant la relation $\Delta n_P \simeq \pm\sqrt{338 \cdot F}$ [222] (où le signe dépend du sens du sur-enroulement).

force, quand il n'y a pas de dénaturation. De plus, les expériences en molécule unique tendent à montrer que le module de torsion C est lui aussi le même quelque soit le sens de sur-enroulement [206, 211–213]. Ces résultats vont donc à l'encontre de l'hypothèse d'une contrainte de torsion dissymétrique à basse force.

Prise en compte du couple Γ dans l'équation cinétique

De la même manière que pour la force F , la contrainte Γ peut intervenir d'une part sur le niveau moyen de la barrière à la migration, et donc dans le terme exponentiel (autrement dit sur la stabilité de la conformation ouverte), et d'autre part dans le terme sinus-hyperbolique (qui traduit la différence de hauteur relative entre la barrière énergétique pour l'avancée et celle pour le recul). Pour chacun de ces deux termes, la contrainte de torsion Γ est associée aux angles caractéristique r_0 et r respectivement. Nous ferons l'hypothèse simplificatrice que les paramètres d et d_0 reliés à l'effet direct de la force ne dépendent pas du couple. Et de même, nous supposons que les paramètres r et r_0 reliés à l'effet du couple ne dépendent pas de la force.

A partir de maintenant, nous abordons la convention suivante pour écrire l'équation cinétique : on posera $F < 0$ dans le cas où $\Gamma < 0$, car dans ce cas la force F s'oppose à la migration. Dans le terme exponentiel, associé à la hauteur moyenne de la barrière, l'effet de la force est indépendant a priori du sens de migration puisque la conformation ouverte est commune aux deux sens de migration ; l'effet doit donc être indépendant du signe de la force. Ainsi, c'est la valeur absolue de la force F qui intervient. En revanche, en ce qui concerne le couple Γ , étant donné que la jonction de Holliday est un objet chiral, on ne peut pas supposer qu'une contrainte de torsion positive va avoir le même effet qu'une contrainte de torsion négative sur la stabilité de la conformation ouverte. Le terme Γ doit donc intervenir avec son signe.

Concernant le terme sinus-hyperbolique, là aussi la contrainte de force apparaît en valeur absolue. En effet, la force F favorise toujours la migration dans le sens positif (allongement des bras verticaux) quelque soit le sens de la contrainte de torsion Γ . En revanche, cette dernière apparaît ici sans valeur absolue, comme dans le terme exponentiel, puisque c'est le signe du couple de torsion qui détermine le sens de migration (et donc le signe du sinus-hyperbolique et de la vitesse V).

Nous obtenons donc l'expression suivante pour la vitesse de migration :

$$V(F, \Gamma(F)) = \delta k_0 \cdot e^{\frac{|F|d_0 + \Gamma r_0}{k_B T}} \cdot 2 \sinh\left(\frac{|F|d + \Gamma r}{k_B T}\right). \quad (5.18)$$

Résultat et analyse

L'ajustement du modèle décrit par l'équation (5.18) sur les points expérimentaux est représenté figure 5.14 (courbe rouge). Dans ce modèle, les paramètres δ , k_0 , d_0 et d ont été fixés à leurs valeurs connues ou obtenues précédemment : $\delta = 0.68$ nm, $k_0 = 2$ s⁻¹, $d_0 = 2.9$ nm et $d = 0.2$ nm. On obtient ainsi pour les deux paramètres ajustables :

$$r_0 = 0.47 \pm 0.04 \text{ rad} \quad \text{et} \quad r = 0.17 \pm 0.01 \text{ rad}.$$

Le nouveau modèle, qui ne contient que deux paramètres libres, passe correctement par les points expérimentaux. D'autre part, les ajustements effectués en faisant intervenir la valeur absolue de Γ dans le terme exponentiel et/ou dans le terme sinus-hyperbolique

échouent à décrire correctement les résultats expérimentaux (figure 5.11, courbes pointillées grises). Ces résultats confortent donc l'analyse précédente sur le modèle décrit par l'équation (5.18) et les signes de F et Γ .

Par ailleurs, de même que précédemment avec les paramètres d_0 et d , les valeurs trouvées ici pour r_0 et r sont compatibles avec la géométrie de la structure (voir figure 5.13). La valeur trouvée pour r ($0.17 \text{ rad} \equiv \sim 0.03 \text{ tr}$) est positive et inférieure à l'angle associé à l'échange d'une paire de bases ($2 \times 2\pi/10.5 \simeq 1.2 \text{ rad} \equiv \sim 0.2 \text{ tr}$) ; cette valeur est donc cohérente avec l'idée physique d'un angle caractéristique pour atteindre la barrière d'énergie. Concernant r_0 , qui est associé au désempilement des bras, la valeur positive trouvée (0.47 rad , c'est à dire 27° ou 0.07 tr), indique qu'une légère rotation des bras est associé à l'ouverture de la structure, et que le changement de conformation est favorisé par un couple de torsion positif.

Conclusion du chapitre

Le modèle simple que nous avons décrit a été développé de façon à être compatible avec ce qui était déjà connu du mécanisme de migration de la jonction de Holliday, et en restant en accord avec les résultats des expériences de cinétique faites par ailleurs. Nous avons essayé d'introduire le moins de paramètres possible ; notamment, nous n'avons pas essayé de prendre en compte l'effet des bulles de dénaturation (excepté leur influence sur le couple de torsion maximum autorisé). De même, nous n'avons pas introduit d'effets de séquence ; bien que nous ayons observé certains signes indiquant la présence d'effets de séquence, nous ne sommes pas parvenu à mettre en évidence le caractère systématique de ces effets. Enfin, nous n'avons pas cherché à imaginer des mécanismes de migration différents de ce qui se passe en l'absence de contraintes mécaniques (par exemple un mécanisme ne passant pas par le dépliement de la structure). Cependant, en l'absence d'expériences supplémentaire, ce modèle suffit actuellement à rendre compte de nos résultats expérimentaux, et en particulier à rendre compte de la dissymétrie de la vitesse de migration vis-à-vis des contraintes mécaniques.

Il ressort finalement de cette étude cinétique que les vitesses de migration mesurées peuvent difficilement s'expliquer sans prendre en compte l'effet des contraintes mécaniques sur la stabilité relative des conformations ouvertes ou empilées de la jonction de Holliday⁸

D'autre part, nous pouvons préciser quelles sont les influences respectives de la force et du couple de torsion. Ainsi, la contrainte de force a pour effet de favoriser la migration dans le sens d'un allongement des bras verticaux ; elle favorise donc systématiquement la migration dans le sens positif et entrave la migration dans le sens négatif. Mais aussi, en favorisant le dépliement de la jonction, la contrainte de force augmente globalement la cinétique de migration. D'autre part, le comportement dissymétrique de la jonction vis-à-vis du signe du couple de torsion révèle directement le caractère chiral de la structure ; plus précisément, le couple de torsion influe sur le dépliement de la jonction de façon asymétrique, introduisant ainsi une dissymétrie dans la cinétique globale du processus de migration.

⁸Je rappelle néanmoins que, contrairement à ce que décrit la théorie de Kramers, nous n'avons pas pris ici en compte d'éventuels effets des contraintes mécaniques sur la forme globale du paysage énergétique en dehors de leurs effets sur la hauteur relative des extrema.

Quatrième partie

Étude du complexe RuvAB

Chapitre 6

Activité du complexe RuvAB (article)

L'un des objectifs de ce travail de thèse a été d'appliquer les techniques de micro-manipulation mécanique de l'ADN pour étudier l'activité du complexe RuvAB en molécule unique. La première étape d'une telle étude est de caractériser le fonctionnement de la protéine dans les conditions optimales, c'est à dire dans le cas d'une recombinaison entre deux molécules d'ADN parfaitement homologues. Le but est ainsi d'obtenir des informations précises quant à l'activité de la protéine, notamment la vitesse à laquelle elle induit la migration et la régularité de son activité. La configuration expérimentale a également permis d'étudier l'effet d'une contrainte de force, positive ou négative, sur l'activité du complexe. Cette étude a donné lieu à une publication ici retranscrite.

Single-molecule study of RuvAB-mediated Holliday-junction migration

A. Dawid*, V. Croquette[†], M. Grigoriev[‡], and F. Heslot*[§]

*Laboratoire Pierre Aigrain, Unité Mixte de Recherche 8551, Ecole Normale Supérieure, 24 Rue Lhomond, 75005 Paris, France; [†]Laboratoire de Physique Statistique, Unité Mixte de Recherche 8550, Ecole Normale Supérieure, 24 Rue Lhomond, 75005 Paris, France; and [‡]Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, Unité Mixte de Recherche 5099, Université Paul Sabatier, IFR109, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 4, France

Communicated by Carlos J. Bustamante, University of California, Berkeley, CA, June 22, 2004 (received for review March 1, 2004)

Branch migration of Holliday junctions is an important step of genetic recombination and DNA repair. In *Escherichia coli*, this process is driven by the RuvAB complex acting as a molecular motor. Using magnetic tweezers, we studied the RuvAB-directed migration of individual Holliday junctions formed between two ≈ 6 -kb DNA molecules of identical sequence, and we measured the migration rate at 37°C and 1 mM ATP. We directly demonstrate that RuvAB is a highly processive DNA motor protein that is able to drive continuous and unidirectional branch migration of Holliday junctions at a well defined average speed over several kilobases through homologous sequences. We observed directional inversions of the migration at the DNA molecule boundaries leading to forth-and-back migration of the branch point and allowing us to measure the migration rate in the presence of negative or positive loads. The average migration rate at zero load was found to be ≈ 43 bp/sec. Furthermore, the load dependence of the migration rate is small, within the force range of -3.4 pN (hindering force) to $+3.4$ pN (assisting force).

Homologous recombination is a fundamental and highly conserved mechanism of genetic content exchange between two homologous DNA molecules and is an essential cellular process required to generate genetic diversity and maintain genome stability. A central intermediate of the homologous recombination is the Holliday junction that connects two recombining DNAs in a four-way branched DNA structure. Branch migration of a Holliday junction, when one DNA strand is progressively exchanged for another, extends the heteroduplex DNA and determines the amount of genetic information transferred between the two DNA molecules (1–3).

In *Escherichia coli*, RuvA, RuvB, and RuvC proteins process the Holliday-junction intermediate toward the formation of two recombinant DNA molecules (4–6). The three Ruv proteins are thought to form two types of complex with the Holliday junction (7): a RuvAB complex that promotes branch migration (8–12) and a RuvABC complex in which RuvC scans the DNA sequence during RuvAB-mediated branch migration and resolves the Holliday junction preferentially at the consensus sequence 5'-(A/T)TT[↓](G/C)-3' (13–15).

Holliday junctions are specifically bound by RuvA tetramers that unfold the junction in a square planar conformation, energetically favorable to branch-point migration (8, 16–20). RuvB is targeted to the Holliday junction by specific interactions with RuvA and has been reported to assemble symmetrically into hexameric rings around opposite DNA arms of the RuvA-junction complex (21–23). RuvAB promotes branch-point migration in an ATP-dependent manner: the DNA is pumped out of the RuvA-junction assembly by and throughout the RuvB hexamers (24). Therefore, orientation assembly of the RuvAB complex determines the direction of migration.

Despite recent advances in the comprehension of how RuvA and RuvB process the Holliday junction, dynamical aspects of the mechanism are poorly known. Here we present direct measurements of the RuvAB complex activity on Holliday junctions at the single-molecule level. The study explores the

dynamical properties of the process and provides direct measurements of the enzyme kinetics.

Materials and Methods

Proteins and DNA Constructs. RuvA and RuvB were expressed and purified as described (12, 25). Protein concentrations were determined by the Bradford method (Bio-Rad) by using BSA as a standard and expressed as moles of monomers.

Two DNA constructs named “multi-ss” and “multiswivel” were used in this work. Both follow the same general scheme (Fig. 1A): a central cruciform core made of oligonucleotides is flanked on the one hand by a pair of short heterologous DNA arms ended by hairpin structures and on the other hand by two long homologous DNA arms with either biotin- or digoxigenin (DIG)-multilabeled ends. Both constructions have the same sequence but differ in their end attachments. Each long homologous DNA arm is obtained from a vector containing the 4.6-kb *KpnI*–*HindIII* fragment of λ DNA inserted into the *KpnI*- and *HindIII*-digested pBluescript KS(+) vector (Stratagene), resulting in a 7.5-kb pk- λ vector (generous gift of D. Bensimon, Ecole Normale Supérieure). The central cross with the hairpin ends is formed by six oligonucleotides (Eurogentec, Brussels): HOLL1, 5'-ACCATGCTCGTGATTACGAGATATCGATGCGAATTCGAGCTCGGTAC; HOLL2, 5'-AGCTGTACCGAGCTCGAATTCGCATGCATCGATATAATACGTGAGGCCTA; HOLL3, 5'-GATCCTAGGCCTCACGTATATATCGATGCATGCGAATTCGAGCTCGACGC; HOLL4, 5'-AGCTGCGTCGAGCTCGAATTCGCATGCATCGATATCTCGTAATCACGAGCA; Hairpin1, 5'-GGATCGAAGCGAGCGAAAGCTCGCTTC; and Hairpin2, 5'-TGGTGAAGCGAGCGAAAGCTCGCTTC.

For both DNA constructs, the long (5.9-kb) DNA arms are designed to give multiple (hence strong) anchoring of the construction while preserving a rotational degree of freedom (see below). For multi-ss, this is obtained by using a single-stranded multilabeled end. For multiswivel, a single-strand discontinuity is incorporated. Precautions have been taken to avoid UV damaging of the DNA constructs during the purification steps.

Multi-ss Construction. A fragment. Three micrograms of vector pk- λ was digested with *BsaI* (NEB, Beverly, MA) and dephosphorylated with shrimp alkaline phosphatase (United States Biochemical) followed by heat inactivation of the phosphatase. For labeling, the DNA solution was complemented at 50 mM NaCl final concentration and incubated with 0.6 μ l of T4 polymerase (NEB) without dNTP added (37°C, 10 min) such that exonucleolytic digestion occurred at the 3' extremities. Then, nucleotides were added (final concentration, 60 μ M dNTP/12 μ M DIG-dUTP) such that the 3'-recessed extremities were filled in (37°C, 1 h) with a fraction of modified nucleotides. The DNA was

Abbreviation: DIG, digoxigenin.

[§]To whom correspondence should be addressed. E-mail: heslot@lpa.ens.fr.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

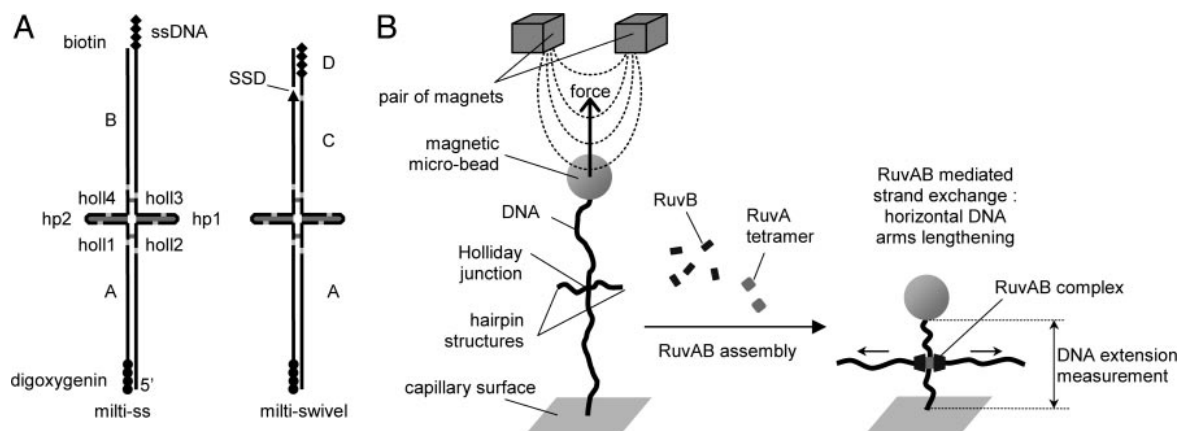


Fig. 1. Configurations. (A) Schemes of the two DNA constructs used (multi-ss and multiswivel) with their subcomponents. Points of ligation are shown in light gray, and sequence heterologies are shown in dark gray. Everywhere else, the sequence is palindromic to enable homologous strand exchange. In the multi-ss construct, no rotational constraint can occur, because the multilabeled biotin end is single-stranded. In the multiswivel construct, a single-strand discontinuity (SSD, arrow) relaxes the rotational constraint. ssDNA, single-stranded DNA. (B) Experimental configuration. A DNA molecule containing a Holliday junction is tethered between the capillary surface and a magnetic microbead (see *Materials and Methods*). Initially, the branch point is restricted inside a 27-bp region of homologous sequence by 3 bp of heterology that impede spontaneous branch migration (26, 27) but not RuvAB-mediated branch migration. A shortening of the tethering length caused by a forward RuvAB-mediated migration is illustrated.

then purified (Wizard SV gel and PCR, Promega) and digested by *Hind*III, which was then heat-inactivated. The annealed oligonucleotide pair HOLL1 and HOLL2 then were ligated to the vector DNA (molar ratio, 100:1) by T4 ligase (NEB) followed by heat inactivation of the ligase. The resulting preparation was electrophoresed on a 1% agarose gel, and the large fragment was recovered from the gel with precautions to avoid UV irradiation of the DNA: the gel was run with side lanes incorporating a small fraction of the preparation. Those side lanes were cut and separately stained with ethidium bromide, and the position of the band was marked under UV. The band in the gel then was excised based on the estimation of its position obtained from the stained side lanes and purified to obtain the A fragment.

B fragment. Three micrograms of vector pk- λ was digested with *Sac*I (NEB), followed by heat inactivation of the endonuclease, and purified. To label the B fragment of the construction, we used terminal deoxynucleotidyl transferase. In a final volume of 15 μ l, 100 mM sodium cacodylate (pH 7.2), 0.2 mM mercaptoethanol, 2 mM CoCl_2 , complemented with 0.5 μ l of 10 mM dTTP, 0.5 μ l of 1 mM DIG-dUTP (Amersham Pharmacia), and 3 units of terminal deoxynucleotidyl transferase (Amersham Pharmacia) per microgram of DNA were incubated for 2 h at 37°C. Then, as for the A fragment, the DNA was purified, digested with *Hind*III, and ligated with the annealed oligonucleotide pair HOLL3 and HOLL4. Finally, the large fragment was extracted while avoiding UV irradiation to give the B fragment.

A-B assembly. In two separate tubes, the A [respectively (resp) B] fragment and the hairpin oligonucleotide Hairpin2 (resp Hairpin1) (molar ratio, 100:1) were ligated. The two tubes then were mixed, and further ligation was performed. The ligase then was heat-inactivated, and the preparation was used without further purification. The appropriate dilution was determined empirically to obtain a few beads tethered within the sample.

Multiswivel Construction. D fragment. Six micrograms of vector pBluescript KS(+) was digested with *Bsa*I and dephosphorylated with shrimp alkaline phosphatase followed by heat inactivation of the phosphatase. Labeling was performed by using the same protocol as for the A fragment with the same concentration ratio between DNA and T4 DNA polymerase. DNA purification and digestion by *Acc*65, followed by heat inactivation of *Acc*65 and DNA purification, gave the D fragment.

C fragment. Three micrograms of vector pk- λ was digested by *Bsa*I and *Acc*65, dephosphorylated by adding shrimp alkaline phosphatase, and purified and digested by *Hind*III followed by heat inactivation of *Hind*III. Ligation at the *Hind*III ends with the annealed oligonucleotide pair HOLL3 and HOLL4, followed by extraction avoiding UV irradiation, gave the C fragment.

A-C-D assembly. In two separate tubes, the A (resp C) fragment and the hairpin oligonucleotide Hairpin2 (resp Hairpin1) (molar ratio, 100:1) were ligated. The two tubes (equimolar concentrations) were then mixed, and an excess of fragment D (10:1) was added for additional ligation. The ligase then was heat-inactivated, and this preparation was used without additional purification.

In this construction, there is a single-strand discontinuity at the connection between C and D, because C has been dephosphorylated before the ligation with D.

Magnetic Tweezers. The magnetic tweezers were built by using an inverted microscope configuration adapted from a setup developed by Croquette and coworkers (28). The sample was contained in a flow chamber composed of a rectangular cross-section capillary tube (inside dimensions, 0.1 \times 1 mm; length, 45 mm). Silicone tubes connected one extremity of the capillary to a small funnel for sample injection and the other extremity to a syringe pump. The capillary was coated with polyclonal antibodies from sheep directed against DIG (Roche Diagnostics). Single DNA molecules, end-labeled with DIG and biotin (see above), were tethered between the capillary surface and streptavidin-coated magnetic microbeads (2.8- μ m-diameter M270 or 1- μ m-diameter MyOne, Dynal, Oslo) (Fig. 1). A pair of NeFeB magnets (4 \times 4 \times 4 mm, separated by 1 mm) was positioned above the sample and motor-controlled to be either vertically translated or rotated along the vertical axis to impose a determined stretching force and a known supercoiling to the tethered DNA molecules. Images of the sample were obtained by using a \times 100 oil objective (Leica C-Plan; numerical aperture, 1.25) and grabbed with a charge-coupled device camera (model CV-M30, JAI, Copenhagen) connected to a personal computer. The microscope was enclosed in a box regulated at a temperature of 37°C.

Measurements. Lateral and vertical bead positions were measured by real-time image analysis (29) at 60-Hz frequency with,

respectively, ≈ 5 and ≈ 20 nm accuracy. In brief, a parallel illumination of the sample creates around the beads a pattern of diffraction rings that depends on the distance of the bead to the focal plane of the objective, i.e., on the vertical position of the bead. Before each experiment, we recorded a calibration profile of the bead of interest: the objective was moved stepwise along the vertical direction, and at each step the corresponding radial profile of the diffraction pattern was recorded. During the experiment, the instantaneous radial profile of the bead obtained from each video frame was compared in real time with the calibration profile to determine the vertical position of the bead. Mechanical drifts of the microscope were corrected by simultaneously tracking a bead stuck on the surface of the capillary and serving as reference.

The force exerted on the tethered DNA molecule by the magnetic gradient field was calculated by analyzing the Brownian movement of the bead and using the equipartition theorem $F = k_{\text{B}} T l / \langle \delta x^2 \rangle$, where l is the molecule extension, T is the temperature, k_{B} is the Boltzmann constant, and $\langle \delta x^2 \rangle$ is the lateral fluctuations of the bead.

Branch-Migration Assay (Experimental Procedure). *Sample preparation.*

To limit nonspecific interactions and aggregation between the beads, anchoring of the DNA molecules was performed without magnesium ions by using a low ionic strength buffer [25 mM Tris-acetate/5 mM EDTA/0.1% (wt/vol) BSA/0.01% (wt/vol) NaN_3]. Holliday junctions were first incubated with an excess of magnetic microbeads for 5 min to obtain bead-DNA attachment. Then, the mixture was injected into the flow chamber and incubated for 6–10 min for the DIG-labeled DNA ends to anchor to the capillary surface. Finally, the flow chamber was gently rinsed (using the syringe pump) with 200 μl of the same buffer to evacuate the free beads in excess.

Then, before injection of the proteins, the flow chamber containing the tethered DNA molecules was rinsed gently with 70 μ l of the reaction buffer chosen for RuvAB [25 mM Tris-acetate, pH 8/10 mM magnesium acetate/100 mM NaCl/1 mM ATP/20 mM phosphocreatine/0.5 mM EDTA/1 mM dTT/0.1% (wt/vol) BSA/0.01% (wt/vol) NaN₃], in which 10% (vol/vol) glycerol was added. Addition of 10% glycerol at this step was essential to avoid artifacts in bead-position measurements: RuvA and RuvB proteins were stored in a 50% (vol/vol) glycerol buffer, resulting in a 10% final glycerol concentration in the buffer containing the proteins. Because the glycerol modifies the optical index of the buffer, the diffraction patterns around the beads were slightly different in the presence or absence of glycerol. Because calibration profiles were recorded before protein injection, preparation of the sample by rinsing with a buffer containing 10% glycerol, and thus the same glycerol condition as in the presence of the proteins, prevented measurements from artifacts that otherwise could give rise to position-determination errors that could take the appearance of sudden changes in the migration rate up to $\approx 40\%$ at the micrometer scale (see Fig. 4 and *Supporting Text*, which are published as supporting information on the PNAS web site).

At this stage, a tethered bead was chosen, and a “supercoiling test” was performed: the magnets were rotated by +100 turns while monitoring the tethering length at ≈ 0.5 pN to check that neither plectonemes nor braids formed, indicating that the bead was tethered by a single nonsupercoilable DNA molecule. Finally, for various vertical positions of the magnets, we determined the corresponding stretching force.

RuvAB-mediated branch-migration measurement. After injection in the flow chamber of 10 μ l of reaction buffer containing the indicated RuvA and RuvB monomer concentrations mixed with 12.5 units/ml creatine phosphokinase, the height of the tethered bead was monitored continuously as a function of time. The RuvAB-mediated branch migration induced the transfer of DNA length

between the vertical and the horizontal DNA arms of the Holliday junction (Fig. 1B). We measured the activity of RuvAB by monitoring in real time the shortening (or lengthening) of the tethering length. By convention we called it forward (resp backward) migration when the tethering length decreased (resp increased). If no migration occurred for a significantly long time or if the anchoring broke, a new tethered bead was chosen and the migration activity was monitored again after the above steps were repeated: recording of the calibration profile, supercoiling test of the tethered molecule, and calibration of the force.

Data Analysis. To determine the contour length of the vertical DNA arms (and thus the branch-point position), the tethered bead height (which measures the vertical DNA arms extension) was divided by the relative extension of double-stranded DNA calculated from force-extension calibration curves measured in the same conditions as for the RuvAB experiment except that no protein was present. The distributions for the branch-migration rates then were obtained by linear fitting the migration runs by using a sliding time window (size as indicated) translated by half its size at each step.

Results

Cyclic Activity. After protein injection, migration can occur in two opposite directions depending on the orientation assembly of the RuvAB complex on the junction. Nevertheless, dissociation of the junction was impeded at (i) the “low-extension” boundary by multiattachments of the vertical DNA arm ends to the capillary and to the bead surface that restrict the branch-point movement and (ii) the “high-extension” boundary by the hairpin structures at the horizontal DNA arm extremities. This configuration resulted in a cyclic activity of the migration process in which the RuvAB complex proceeded to forth-and-back migrations between the molecule extremities (see Fig. 2 *Left*). However, at the high-extension boundary, we could not tell whether the cruciform structure was maintained with the branch point blocked before or inside the heterologous region or whether the cruciform structure was absorbed completely by a total backward migration. The latter event would result in the formation of a transient denaturation bubble and an estimated length change of ≈ 22 nm, which might be easily hidden in the Brownian noise.

Influence of RuvA and RuvB Concentrations, Processivity, and Unidirectionality. Preliminary experiments were done to determine the optimal RuvA and RuvB concentrations to be injected in our assay. Fig. 2 shows an experiment performed with a multi-ss construct and illustrates the effect of increasing the RuvB concentration from 150 (Fig. 2 *Left*) to 670 nM (Fig. 2 *Right*) in the presence of 100 nM RuvA. At 150 nM RuvB (Fig. 2 *Left*), the enzyme processed branch migration continuously, at a constant speed along the 6 kb of the DNA arms, and unidirectionally until the migration process was stopped and reversed at the molecule extremity. Short pauses or irregularities in the motion were sometimes observed (none appear on this recording). At 670 nM RuvB (Fig. 2 *Right*), mainly two differences could be seen compared with the activity at 150 nM RuvB. First, the migrating complex was destabilized, because we could see motion reversal before reaching the construction boundaries. Also, irregularities in the migration speed (Fig. 2 *Right*, arrows) were seen at a higher frequency of occurrence. Second, when the branch point had reached the high-extension boundary, the waiting time for the migration to reverse was decreased (i.e., the migration-initiation efficiency was increased). Clearly, when the branch point reached the low-extension boundary, the time for the migration to reverse was shorter than at the high-extension boundary; this was a general feature of all our experiments and may reflect the fact that, at the low-extension boundary, there was more DNA arm length left than at the high-extension boundary to facilitate

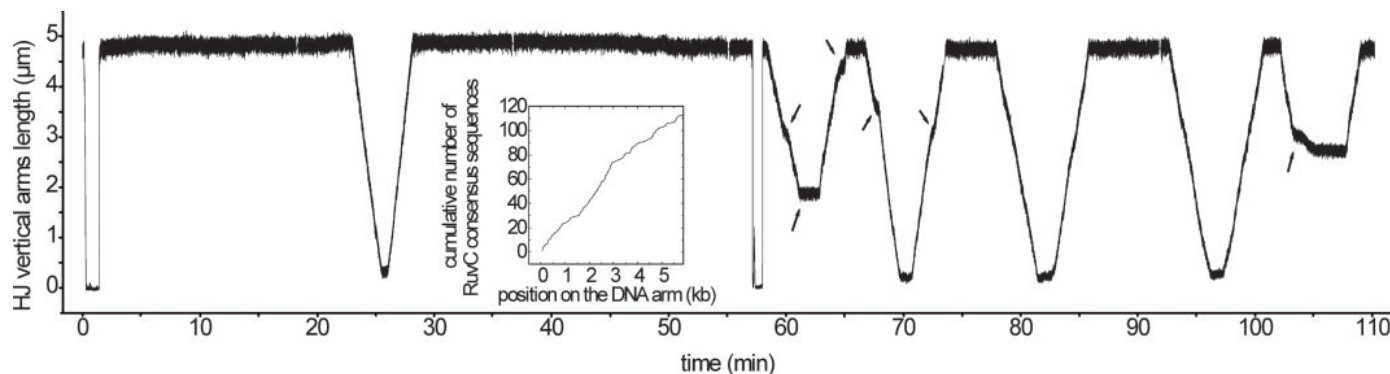


Fig. 2. Influence of RuvB concentration. The experiment was performed by using a multi-ss construction. All along this experiment, the same DNA molecule was followed, and a constant load force of 0.73 pN was applied. In the first part of the experiment (from 0 to 58 min), 100 nM RuvA and 150 nM RuvB were injected in the sample (see the downfall near 0 min). In the second part (from 58 to 110 min), 100 nM RuvA and 670 nM RuvB were injected (see the downfall near 58 min). Whereas in the presence of 150 nM RuvB only one back-and-forth migration occurs during ≈ 1 h and with a nearly constant speed, in the presence of 670 nM RuvB the frequency of back-and-forth migrations is clearly higher and the migrations are less regular, because one can perceive migration inversions (arrows) and more frequent variations in speed (arrows). (Inset) Repartition of the RuvC consensus sequence 5'-(A/T)TT(G/C)-3' along the vertical DNA arm sequence (a high slope corresponds to a high density of RuvC consensus sequences).

the loading of RuvB hexamers. At lower concentrations of RuvB (<100 nM), seldom migration activity was detected (data not shown), indicating a dramatic drop in the migration-initiation efficiency.

The influence of RuvA concentration was also tested in the presence of 150–300 nM RuvB monomers. Varying the RuvA concentration to 10, 100, and 700 nM had no perceptible effect (data not shown). Moreover, no migration activity was detected at RuvB monomer concentrations of 0.3, 0.67, 1.5, and 4 μ M when experiments were performed in the absence of RuvA (data not shown).

However, with this multi-ss construct, the migration-initiation frequency was found to dramatically decrease after ≈ 1 h. We therefore designed another Holliday-junction molecule: the multiswivel construct, similar to the multi-ss construct for its central core but differing by its end attachment. No “aging” of the sample was observed with it, and the initiation efficiency at the high-extension boundary was similar compared with the multi-ss construct. However, the initiation efficiency at the low-extension boundary (i.e., Holliday junction in the close vicinity of the single-strand discontinuity, which appears to constitute a block for the branch-point migration) was reduced very substantially with respect to multi-ss construct (data not shown). We have no explanation for the aging of the sample with the multi-ss construct, but it seems to be linked to the presence of the single-stranded tail.

In the following experiments, the multiswivel construct was used, avoiding the aging of the sample, and concentrations of 100 nM RuvA and 200 nM RuvB were used to avoid the perturbing effects of high RuvB concentrations and maintain a reasonable migration-initiation efficiency.

Branch-Migration Rate and Influence of the Force. From the experimental configuration, a 1-bp translocation of the branch point along the sequence led to a 2-bp reduction in the tethering length. Therefore, the branch-migration rate and the rate of the enzyme were taken here by definition to be half the rate of variation of the total tethering DNA contour length, which corresponded to the sum of the length of the two opposed vertical arms.

Thanks to the cyclic activity of RuvAB, and by using the multiswivel construct, we could explore the effect of both negative and positive loads on the complex kinetics. In the forward motion (resp backward), the force was hindering (resp assisting) the migration, and thus the sign of the load was taken

as negative (resp positive). The level of force explored covered the range of ± 0.7 to ± 3.4 pN. Examples of cumulative forward- and backward-migration runs are represented in Fig. 3A. Distributions of branch-migration rates for the corresponding levels of force are represented in Fig. 3B. They were calculated as indicated in *Materials and Methods*. The time window was chosen so as to find a compromise between the following constraints: (i) the Brownian noise should not dominate the signal (which implies the use of the largest time window) and (ii) the treatment should be sensitive to variations in the complex kinetics (which implies the use of the smallest time window). We chose a time window of 10 sec for the lowest force level of 0.7 pN and used a value of 5 sec for all the points at higher forces.

Fig. 3C represents the migration velocity vs. force data obtained for all levels of force explored. Two types of error bars are represented. The larger bars correspond to the width of the Gaussian fit shown in Fig. 3B, and the smaller bars correspond to the standard errors of the mean obtained from the same Gaussian fit. The effective error for the determination of the average velocity is clearly at an intermediate level between the estimated standard deviation and the estimated error of the mean. The absence of a clear overlap of the error of the mean between neighboring points indicates that the effective error of the mean is larger than calculated for each point. We identified several possible (not mutually exclusive) candidate explanations for the “missing” source(s) of error: (i) when we calculated the “error of the mean,” it was assumed that the data followed Gaussian statistics and the calculation derived from the properties of a Gaussian model; (ii) on the velocity vs. force curve, it is not excluded that the enzyme-to-enzyme variability was still apparent as a variation from point to point; and (iii) the error of the mean obtained by the fit did not take into account the uncertainty on the relative extension factor of the molecule (see the Fig. 3 legend).

The data points for the mean velocity in Fig. 3C are within $\pm 10\%$ of a slightly increasing line, and the RuvAB-mediated branch-migration rate is only weakly force-sensitive: the rate increases slightly or decreases slightly depending on whether the load assists or hinders, respectively, the migration. The estimation of the rate at zero force was obtained by a linear fit to the data (Fig. 3C, dashed line) and was found to be ≈ 14.6 nm/sec, corresponding to ≈ 43 bp/sec of branch-migration rate with an error estimate on the average of $\pm 10\%$.

Discussion

Influence of RuvB Concentration. Influence of the RuvB concentration on the migration process, in the presence of 100 nM

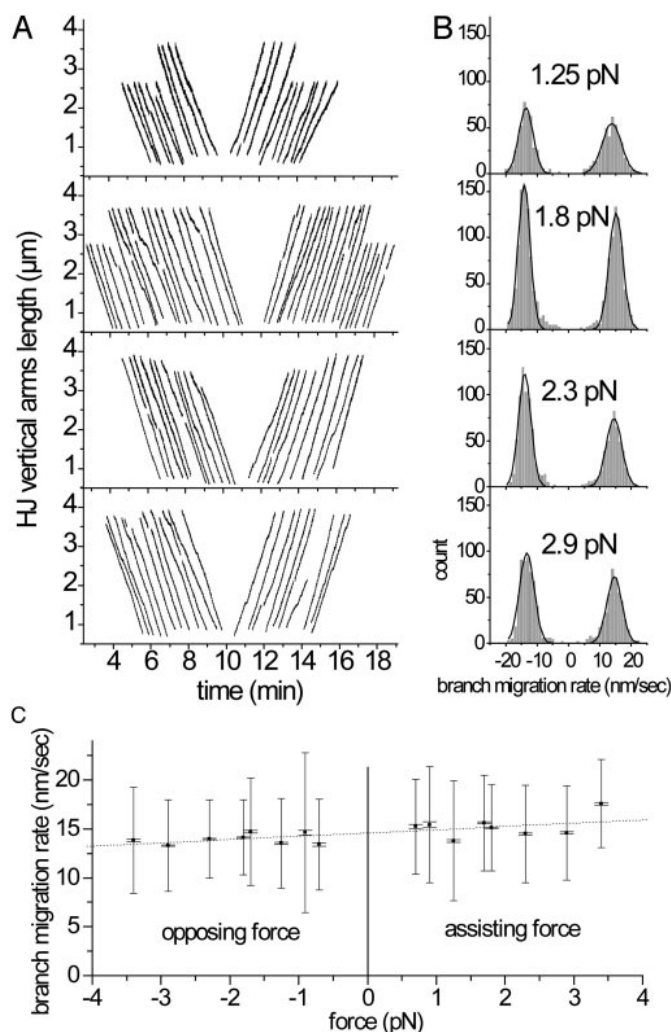


Fig. 3. RuvAB-mediated branch-migration rate and effect of the applied load. In all experiments, the multiswivel construct was used, and concentrations of RuvA and RuvB were 100 and 200 nM, respectively. (A) Example of migration runs (grouped for presentation convenience). Because the maximum extension may vary from molecule to molecule, runs do not have the same length. Runs usually come in pairs of forward and backward migration, resulting in the apparent symmetry of the figure. Short breaks appearing in some abutted runs correspond to either short computer-generated interruptions of the recording for data storage or clear pauses that were manually removed for the velocity determination. (B) Branch-migration rate distributions (in nm/sec) for four levels of force (1.25, 1.8, 2.3, and 2.9 pN) obtained as indicated in *Materials and Methods* with a time window of 5 sec. Positive and negative peaks correspond to forward and backward migrations, respectively. Histograms were fitted with Gaussian distributions. (C) Branch-migration rate vs. force. Sign convention: negative loads correspond to forces that hinder the migration. Rates were obtained by the Gaussian fits in B. Two types of error bars are represented. The larger bars correspond to the width of the Gaussian fit, and the smaller bars correspond to the standard errors of the mean obtained from the Gaussian fits in B. The experimental error on the force applied to a given molecule was estimated to be approximately $\pm 10\%$ (position on horizontal axis) and is not represented. Experiments with force within $\pm 5\%$ were grouped together. The error of the mean obtained by the fit does not take into account the uncertainty of the relative extension factor of the molecule: because the uncertainty of the determination of force was estimated to $\pm 10\%$, this induces a typical uncertainty ranging here from $\pm 2\%$ at 1 pN, lowering under $\pm 1\%$ above 2 pN.

RuvA, has been studied and showed mainly two effects: a perturbation of the RuvAB complex activity at high RuvB concentration and an influence on the migration-initiation frequency. First, the perturbation of the RuvAB complex activity at

high RuvB concentrations may reflect interactions between RuvB and the migrating complex. Such interactions then could lead to the formation on the branch point of nonproductive overloaded RuvAB complexes eventually containing additional RuvB monomers binding the RuvAB complex or where RuvB hexamers are positioned on adjacent DNA arms (14), the simultaneous activity of which would result in nonproductive work. Alternatively, the destabilization can result from interaction of the migrating complex with RuvB hexamers or RuvAB complexes assembled on the duplex DNA arms. Second, at high RuvB concentration the migration cycle frequency is increased significantly. This effect is mainly caused by a decrease of the waiting time needed for the branch migration to restart after a total backward migration when the branch migration is arrested at the high-extension boundary. This observation shows that, at this extremity, the RuvB hexamer assembly is one of the limiting steps of the reorganization of the RuvAB complex for the migration inversion, and thus starting a new forward migration proceeds by the incorporation of new RuvB molecules (and not by a conservation and rearrangement of the components of the complex, which should be independent of the RuvB concentration). At this position, the reorganization of the complex can thus occur in two possible ways: (i) by an initial dissociation followed by a reassembly of the RuvAB complex or (ii) by the binding of new RuvB on the alternate arms of the junction, forming a transient overloaded complex (14) followed by the dissociation of the former RuvB.

When <150 nM RuvB was injected, we observed very few migrations, which is in agreement with previous studies (30, 31) in which global RuvAB branch-migration activity or ATP hydrolysis were observed to be significantly reduced at RuvB concentration below $\approx 0.2 \mu\text{M}$. This observation may reflect the need for a minimum RuvB monomer concentration for RuvB hexamers to assemble cooperatively.

Influence of RuvA Concentration. In our experiments, Holliday-junction migration has not been observed in the absence of RuvA even at high RuvB concentrations. Noticing that our buffer contained 100 mM NaCl, this result is in agreement with the inhibitory effect of NaCl on the RuvB-only migration activity (30). The initiation frequency was not modulated by the RuvA concentration, indicating that the RuvA–Holliday-junction dissociation-reassembly process may not be the limiting event in an RuvAB–Holliday-junction complex reorganization and/or that the RuvA–Holliday-junction complex is highly stable. One also deduces that an excess of free RuvA tetramers does not sequester RuvB, indicating that the RuvAB complex assembles cooperatively with (or is stabilized by) the Holliday junction. Finally, the absence of perturbing effects on RuvAB migration at high RuvA concentration agrees with the high specificity of RuvA for the Holliday junction [$>1,000$ -fold higher than for duplex DNA (32)] and indicates that any putative interaction of RuvA with linear double-stranded DNA is not stable enough and/or tight enough to impede or block the migration of a RuvAB–Holliday-junction complex.

Processivity and Regularity of the Migration Process. At the RuvA and RuvB concentrations subsequently chosen (100 and 200 nM, respectively), the migration process was quite regular, with some occasional perturbations. The present work demonstrates that RuvAB is highly processive. Blocking of the RuvAB complex, and its rearrangement to restart the migration in the other direction, essentially occur at the extremities of the construction. First, this finding indicates that the bidirectionality of RuvAB observed here does not reflect a capacity of the complex to reverse the migration direction by a spontaneous conformational change, but rather it is induced by some constraints to the migration. Second, it indicates that, in our experiment, the DNA

molecule length was the most limiting factor to the processivity of the complex, and we thus obtain a lower bound for the enzyme processivity.

We do not know whether multiple hexamers of RuvB bind to the junction itself. In the condition used, in which the RuvB concentration was not too high, it is probable that two hexamers assemble, although we cannot exclude the possibility of only one hexamer assembling on the junction. Also, the formation of RuvAB complexes along double-stranded DNA had been suggested from experiments with DNA containing no Holliday junction, in which the RuvA/B ATPase activity was found to be stimulated by DNA (9, 21, 31, 32). With the concentration chosen above, the presence of those putative complexes was undetected in our experiments (we initially expected that they might possibly lead to velocity variations near the extremities of the construction if they could be pushed like beads on a string by the junction migration).

Motion of the enzyme was found to be processive through DNA sequences that contain multiple RuvC consensus sequences. Fig. 2 *Inset* represents the repartition of the RuvC consensus sequences along the DNA arms of the junction. On average, a consensus sequence appears every 64 bases (i.e., approximately every second at branch-migration rates of ≈ 43 bp/sec), which is below the experimental resolution of velocity changes. However, the repartition density of the RuvC consensus sequences vary substantially from one region to another. If these sequences would induce pauses of RuvAB, we should observe reproducible sequence-dependent variations of the migration rate from one region to another. No such reproducible feature could be seen (compare Figs. 2 and 3 and data not shown), which indicates a sequence independence of the RuvAB migration activity. Hence, this observation strengthens the model of RuvC acting in an RuvABC complex rather than the assumption that RuvAB dissociates from the Holliday junction or pauses at the RuvC consensus sequences to allow efficient cleavage by RuvC.

Velocity of the RuvAB Molecular Motor. The RuvAB-mediated branch-migration rate was measured as a function of the force applied to the tethered Holliday junction. The migration rate was

found to be only weakly sensitive to the applied force in the range covered. The average velocity slightly increases (resp slightly decreases) if the force assists (resp hinders) the branch migration. The value determined here for the rate at zero load is ≈ 43 bp/sec. Tsaneva *et al.* (33) measured the migration rate on an α -structure intermediate from a gapped circular and a linear DNA of ≈ 5 kb each. At the beginning of the time course, the Holliday junction was approximately in the middle of the linear fragment so that the arms had an initial length of 2.5 kb. Because it took 2.5–5 min to obtain the products, the branch-point migration velocity was 10–20 bp/sec. Thus, there is a factor ranging from 2 to 4 between the two experimental determinations: 43 bp/sec compared with 10–20 bp/sec. Because this previous study was performed in the absence of salt, we performed control experiments in which no salt was added to the reaction buffer. Within the 10% uncertainty, the same migration rates were obtained as in the presence of salt (data not shown), ruling out this origin for the discrepancy. Therefore, we interpret the difference with Tsaneva *et al.* (33) by the following: In the present experiment, the migration velocity is obtained directly from active RuvAB complexes. In the bulk experiment, it is not clear whether the molecules (in their majority) taken into account for the rate measurement already have an enzyme loaded and are actively moving the junction right from the beginning after the initial mixing with the enzyme. Reinforcing this argument is the fact that we observed a lag time to wait until a migration starts, probably reflecting the time needed for an active complex to assemble. This waiting time was commonly larger than the time taken to perform the full-length translocation (equivalent to runoff).

In conclusion, this single-molecule study of RuvAB-mediated Holliday-junction migration allows a direct *in vitro* measurement of the extremely important process of RuvAB-driven genetic-material exchange between two homologous DNA strands and provides information on the processivity and velocity of RuvAB activity.

This work was funded by Centre National de la Recherche Scientifique, Ministère de la Recherche, and Paris-6 and Paris-7 Universities.

- Holliday, R. (1964) *Genet. Res.* **5**, 282–304.
- Dressler, D. & Potter, H. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 727–761.
- Kowalczykowski, S. C., Dixon, D. A., Eggleston, A. K., Lauder, S. D. & Rehrauer, W. M. (1994) *Microbiol. Rev.* **58**, 401–465.
- West, S. C. (1997) *Annu. Rev. Genet.* **31**, 213–244.
- Shinagawa, H. & Iwasaki, H. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 107–111.
- West, S. C. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 1237–1241.
- West, S. C. (1998) *Cell* **94**, 699–701.
- Parsons, C. A., Stasiak, A., Bennett, R. J. & West, S. C. (1995) *Nature* **374**, 375–378.
- Shiba, T., Iwasaki, H., Nakata, A. & Shinagawa, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8445–8449.
- Parsons, C. A., Tsaneva, I., Lloyd, R. G. & West, S. C. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5452–5456.
- Iwasaki, H., Takahagi, M., Nakata, A. & Shinagawa, H. (1992) *Genes Dev.* **6**, 2214–2220.
- Tsaneva, I. R., Illing, G., Lloyd, R. G. & West, S. C. (1992) *Mol. Gen. Genet.* **235**, 1–10.
- Shah, R., Bennett, R. J. & West, S. C. (1994) *Cell* **79**, 853–864.
- van Gool, A. J., Hajibagheri, N. M. A., Stasiak, A. & West, S. C. (1999) *Genes Dev.* **13**, 1861–1870.
- van Gool, A. J., Shah, R., Mezard, C. & West, S. C. (1998) *EMBO J.* **17**, 1838–1845.
- Hargreaves, D., Rice, D. W., Sedelnikova, S. E., Artymiuk, P. J., Lloyd, R. G. & Rafferty, J. B. (1998) *Nat. Struct. Biol.* **5**, 441–446.
- Ariyoshi, M., Nishino, T., Iwasaki, H., Shinagawa, H. & Morikawa, K. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8257–8262.
- Roe, S. M., Barlow, T., Brown, T., Oram, M., Keeley, A., Tsaneva, I. R. & Pearl, L. H. (1998) *Mol. Cell* **2**, 361–372.
- Panyutin, I. G. & Hsieh, P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2021–2025.
- Panyutin, I. G., Biswas, I. & Hsieh, P. (1995) *EMBO J.* **14**, 1819–1826.
- Mitchell, A. H. & West, S. C. (1994) *J. Mol. Biol.* **243**, 208–215.
- Stasiak, A., Tsaneva, I. R., West, S. C., Benson, C. J. B., Yu, X. & Egelman, E. H. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7618–7622.
- Yu, X., West, S. C. & Egelman, E. H. (1997) *J. Mol. Biol.* **266**, 217–222.
- Hiom, K. & West, S. C. (1995) *Cell* **80**, 787–793.
- Grigoriev, M. & Hsieh, P. (1998) *Mol. Cell* **2**, 373–381.
- Biswas, I., Yamamoto, A. & Hsieh, P. (1998) *J. Mol. Biol.* **279**, 795–806.
- Panyutin, I. G. & Hsieh, P. (1993) *J. Mol. Biol.* **230**, 413–424.
- Strick, T. R., Allemand, J. F., Bensimon, D., Bensimon, A. & Croquette, V. (1996) *Science* **271**, 1835–1837.
- Gosse, C. & Croquette, V. (2002) *Biophys. J.* **82**, 3314–3329.
- Mitchell, A. H. & West, S. C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19497–19502.
- Marrione, P. E. & Cox, M. M. (1996) *Biochemistry* **35**, 11228–11238.
- Dickman, M. J., Ingleston, S. M., Sedelnikova, S. E., Rafferty, J. B., Lloyd, R. G., Grasby, J. A. & Hornby, D. P. (2002) *Euro. J. Biochem.* **269**, 5492–5501.
- Tsaneva, I. R., Muller, B. & West, S. C. (1992) *Cell* **69**, 1171–1180.

Supporting Information : Avoiding potential artifacts due to glycerol on measurements of beads position

Glycerol-induced non-linearity in measurements of the vertical position of the beads

To determine the glycerol-induced effects in measurements of the vertical position of the beads, we use a reference bead stuck on the surface. First, for a given fluid in the capillary tube, a standard calibration profile of the bead is recorded by vertically translating the microscope objective by 32 steps of ~ 250 nm and by recording at each step the corresponding profile. Then the following test is done using either another fluid composition or the same fluid in the capillary: the focal plane is moved by vertically translating the objective, (thus simulating a vertical translation of the bead) and the program measures from the image what is the apparent height of the bead as calculated from the calibration profile that has been recorded previously. For this test, the same reference bead is tracked while the objective is translated by 128 steps of ~ 60 nm. Then the apparent height of the bead is subtracted from its effective height imposed by controlled changes of the objective position. Ideally the difference should be zero as the apparent vertical displacement of the bead must correspond to the vertical displacement of the objective.

Figure 4A shows the corresponding measurements in three conditions. The test measurement is first performed as described above but before injection of glycerol (black curves, two repeats with the same bead and the same calibration profile, and the same fluid [reaction buffer] for calibration and mock measurement). The difference between the measured and expected position along the ~ 7 μm scanned by the objective is approximately constant with a typically 20 nm discrepancy due to limitations of the technique. A possible non-zero offset may exist due to slow thermal or mechanical drifts arising in the time lapse between the calibration profile recording and the measurement, limiting the absolute positioning of a bead at ~ 100 nm. But the relative positioning error remains about ~ 20 nm. The same test is then performed after injection of 10% (v/v) glycerol, but with the calibration profile recorded before glycerol injection (red curves). The difference between expected and measured position is no longer constant but may vary about ~ 100 nm for $1\mu\text{m}$ of objective displacement. Optical index of a 10% glycerol solution at 37°C was found to be 1.346, which is only $\sim 1\%$ above the optical index of water of 1.331. Apparently, this 1% difference is sufficient to dramatically decrease the quality of the measurement. When the test is performed again, but this time with a new calibration profile recorded after glycerol injection (blue curves), the difference between expected and measured position is again approximately constant with ~ 20 nm discrepancy.

Effect on a migration run measurement

Figures 4B shows a migration run measured in 10% glycerol but using calibration profiles done in absence of glycerol. Because in this case the precaution had not been taken to have the same glycerol concentration during calibration profile recordings and during measurements, glycerol-induced non-linearity results in apparent variations of the rate measured during a branch migration run. The variation pattern is quite reproducible when back and forth migrations occur on the same molecule. From one molecule to another, we found that the pattern could be vertically shifted with respect to the sequence (data not shown), an element arguing for an artifact and not a sequence effect. Such a pattern of velocity change was never seen when

calibration profiles were recorded in the same buffer and glycerol concentration used when the proteins are injected. When the above artifact is not eliminated, the measured branch migration rate vary typically from 23 nm/s to 33 nm/s leading to ~40% of apparent variations.

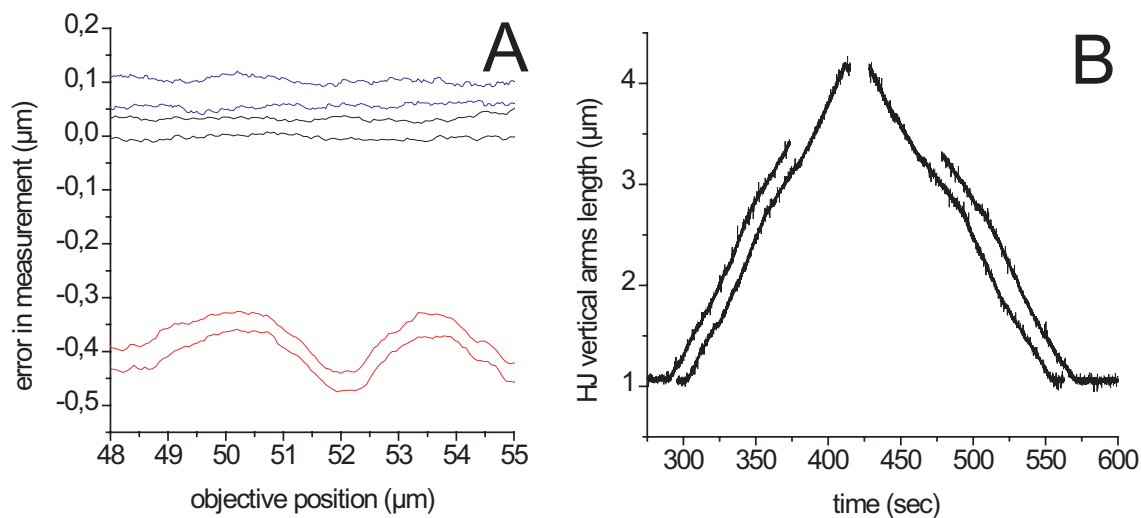


Fig 4: (A) Effect of the glycerol on linearity measurements. Difference, in function of the microscope objective position, between the measured and expected apparent position of a reference bead stuck on the capillary surface in three different conditions : black curves, measurement in absence of glycerol with a calibration profile recorded in absence of glycerol; red curves, measurement in presence of 10% glycerol with a calibration profile recorded in absence of glycerol; blue curves, , measurement in presence of 10% glycerol with a calibration profile recorded in presence of 10% glycerol. (B) Example of artifact in branch migration rate measurements due to glycerol-induced non-linearity. It appears, in the speed of the enzyme, a reproducible pattern of sudden variations up to 40%.

Chapitre 7

Rôle de la protéine RuvA

Il a été montré que RuvA, en se chargeant sur la jonction, contraint celle-ci à adopter une conformation ouverte. On peut donc raisonnablement penser que ce rôle structural de RuvA permet de faciliter la migration de la jonction. Cependant, jusqu'à présent aucune expérience n'a été faite pour mettre directement en évidence cet effet ; il n'est donc pas exclu qu'en se chargeant sur la jonction RuvA établisse des interactions spécifiques avec l'ADN, qui, en l'absence de RuvB, entraîneraient au contraire un blocage la migration.

Après avoir analysé le comportement de la jonction de Holliday en présence d'ions magnésium (chapitre 5), nous pouvons maintenant aborder la question de savoir comment ce comportement est modulé en présence de RuvA. Pour ce faire, on répété le même type d'expériences que celles effectuées précédemment : on commence tout d'abord par former la jonction et l'on vérifie que la dynamique de migration correspond bien à ce que l'on attend en présence d'ions divalents. Ensuite RuvA est injecté dans l'échantillon et son effet sur la cinétique de migration est examiné.

Nous allons voir que RuvA a bien pour effet de faciliter l'échange des simples brins, mais qu'en revanche, dans notre configuration en molécule unique, sa présence empêche l'extrusion d'une jonction de Holliday à partir d'un ADN linéaire.

7.1 Cinétique de la migration en présence de RuvA

7.1.1 RuvA facilite la migration de la jonction

Examinons ce qui se passe d'un point de vue cinétique (figure 7.1). En l'absence de protéine et à 2 pN (figure 7.1-a), la migration de la jonction présente la dynamique vue précédemment : en sur-enroulement positif, le couple de torsion n'est limité que par le couple de formation des plectonèmes (ici $\Gamma_P \simeq 18 \text{ pN} \cdot \text{nm/rad}$) qui est ici suffisamment élevé pour pouvoir entraîner efficacement la migration de la jonction. En revanche, en sur-enroulement négatif, la friction à la migration de la jonction est suffisante pour pouvoir induire la dénaturation de la double hélice. Le couple pouvant s'exercer sur la molécule atteint ainsi le couple limite de dénaturation : $\Gamma_d \simeq 9 \text{ pN} \cdot \text{nm/rad}$. Il en résulte un retard vis-à-vis du sur-enroulement et une dynamique de migration très lente, comme sur la figure 5.7.

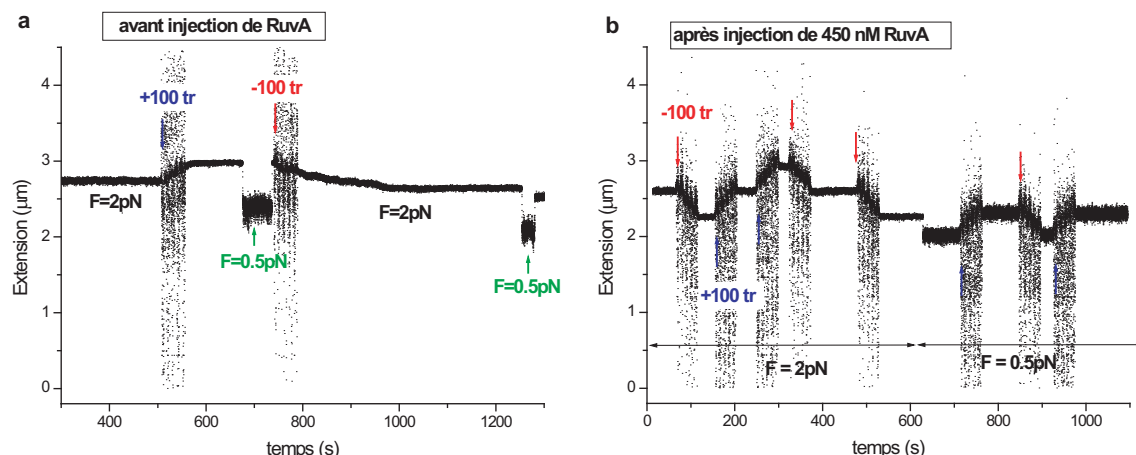


FIGURE 7.1 – *Cinétique de migration sans puits avec RuvA, en présence de 10 mM Mg^{2+} : tracés de l'extension de la molécule au cours du temps. (a) Effet sur la jonction des sur-enroulements appliqués à une force de 2 pN en l'absence de RuvA. En sur-enroulement positif, le couple pouvant être induit dans la molécule n'est limité que par le couple de formation des plectonèmes ($\Gamma_P \simeq 18 \text{ pN} \cdot \text{nm/rad}$ ici), et il est suffisant pour entraîner efficacement la jonction en migration puisqu'on n'observe pas de retard par rapport à la rotation des aimants. En sur-enroulement négatif, l'absence de variation dans l'extension après les -100 tr (on observe seulement une baisse partielle) indique une dénaturation de l'ADN. Le couple est donc limité au couple de dénaturation : $9 \text{ pN} \cdot \text{nm/rad}$, et on observe dans ce cas une dynamique de migration très lente. A la fin de la migration, la force est abaissée à 0.5 pN pour contrôler, en observant que la bille ne va pas au sol, qu'il n'y a pas formation de plectonèmes. Ceci indique qu'il ne reste plus de supertours dans la molécule et que la relaxation par migration est complète. (b) Même expérience, mais en présence de 450 nM de RuvA. On constate que la migration se fait très facilement aussi bien dans le sens positif que négatif (pas de retard de la migration par rapport au sur-enroulement imposé par les aimants), et ceci aussi bien à 2 pN qu'à 0.5 pN.*

Après injection de 450 nM de RuvA (figure 7.1-b), on constate cette fois que dans les mêmes conditions de force, la jonction migre à la même vitesse que l'on tourne les aimants. Ce résultat reste valable à plus basse force (figure 7.1-b, points au delà de 600 s), et il montre que la seule présence de la protéine RuvA permet à la jonction de migrer facilement même dans les conditions défavorables où il y a présence d'ions magnésium.

7.1.2 Recherche d'une éventuelle friction à la migration en présence de RuvA

Nous avons cherché à mettre en évidence un éventuel reliquat de friction, dû soit directement à la présence de magnésium, soit à la protéine RuvA elle-même. Pour cela, des expériences ont été faites où la vitesse de rotation des aimants a été montée à leur maximum de 6 tr/s (figure 7.2). En cas de friction, on s'attendrait à un retard de la

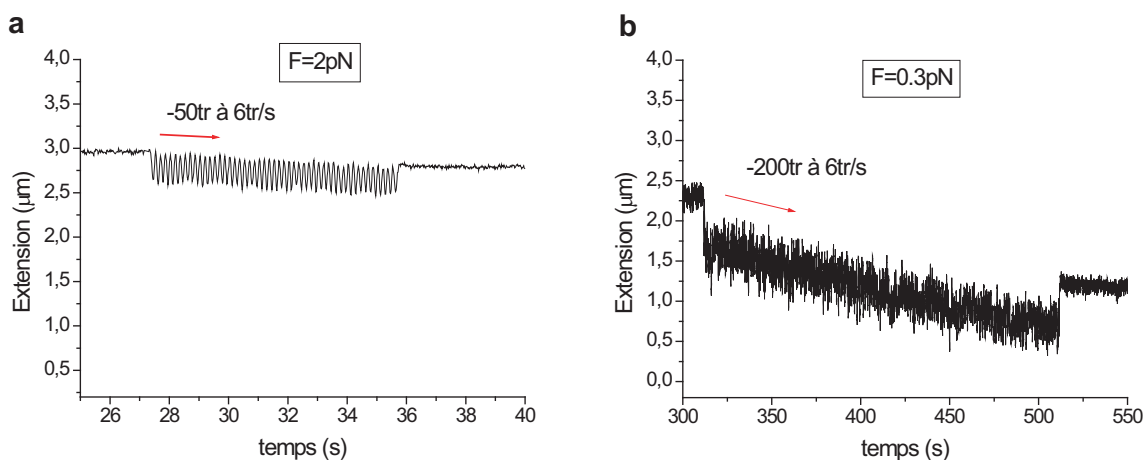


FIGURE 7.2 – *Expériences à grande vitesse : migration de la jonction en présence d'ions magnésium* ($[Mg^{2+}] = 10 \text{ mM}$) *et de RuvA* ($[RuvA] = 100 \text{ nM}$), *et à une vitesse de rotation des aimants de 6 tr/s*. Pour réaliser cette expérience, un système d'amortissement des vibrations a été mis en place autour des moteurs. Ce système s'est révélé efficace car l'on ne distingue plus les vibrations habituellement visibles sur les expériences précédentes pendant la rotation des aimants. (a) Une molécule contenant une jonction de Holliday déjà extrudée est sous-enroulée de 50 tr à 6 tr/s et à 2 pN. Au cours de la rotation, on peut distinguer un signal sinusoïdal dans l'extension. Ce signal correspond à la rotation de la bille (on peut vérifier qu'il contient 50 périodes) et il a probablement pour origine une légère dissymétrie de l'allure des anneaux d'interférence autour des billes. Cette dissymétrie conduit, lorsque ΔLk prend une valeur non-entière au cours de la rotation, à un déphasage entre l'image apparente et l'image de calibration, enregistrée elle pour une orientation fixée de la bille. Ce déphasage conduit à une erreur systématique et reproductible dans la détermination de la position verticale de la bille pendant la rotation. De plus, du fait de ce déphasage, au cours du sur-enroulement l'extension apparaît en moyenne décalée vers le bas. (b) Même expérience qu'en (a) excepté que la molécule est sous-enroulée de -200 tr et à une force de 0.3 pN. Bien que l'amplitude du mouvement brownien empêche ici de distinguer les oscillations observées en (a), on observe un décalage important de l'extension moyenne au cours du sous-enroulement. Ce décalage est ici beaucoup plus grand qu'en (a) et ne peut pas être dû uniquement à l'artefact de déphasage (voir texte).

migration par rapport au sur-enroulement, et donc on devrait générer, selon le niveau de force, soit de la dénaturation soit des plectonèmes. Dans les deux cas, la migration se ferait à couple constant (couple de dénaturation ou couple de formation des plectonèmes), et les vitesses de migration seraient donc déterminées par ces couples et non par la vitesse de sur-enroulement. La migration devrait donc progressivement accumuler du retard par rapport au sur-enroulement. Dans l'un des cas, un tel retard devrait se traduire par la formation de bulles de dénaturation et donc par une extension qui ne baisse pas autant que ce à quoi l'on s'attendrait. Dans l'autre cas, l'accumulation progressive de plectonèmes devrait entraîner une diminution de l'extension plus rapide que celle attendue.

Dans un premier temps (figure 7.2-a) l'expérience a été réalisée à 2 pN, force suf-

fisante pour atteindre le couple de dénaturation de l'ADN. Dans un second temps (figure 7.2-b), une force plus faible est utilisée (0.3 pN) afin de travailler à un couple plus faible. Ceci permet d'une part d'éviter la dénaturation pour que seuls des plectonèmes puissent éventuellement se former. D'autre part, en cas de présence d'un reliquat de friction, cela permet de limiter la valeur du couple induit et de ralentir au maximum la migration, permettant ainsi d'amplifier au maximum le retard. Finalement, aucune accumulation de retard n'est observée, ni à 2 pN (figure 7.2-a) ni à 0.3 pN (figure 7.2-b).

En revanche, on constate l'existence d'un décalage dans l'extension pendant le sous-enroulement. A haute force (figure 7.2-a), le très faible mouvement brownien permet de voir que ce décalage est exactement relié à la rotation des aimants (variation sinusoïdale de l'extension). L'interprétation de cet effet est que l'image de la bille n'a pas une symétrie parfaitement cylindrique, ce qui entraîne, au cours de la rotation de la bille, un déphasage entre l'image mesurée en temps réel et l'image de calibration pré-enregistrée, et donc un artefact reproductible dans l'estimation de l'extension. Cet artefact peut donc expliquer le décalage global du tracé au cours de l'extension. A basse force (figure 7.2-b), l'amplitude du mouvement brownien ne permet plus de distinguer les oscillations de l'extension, mais néanmoins le décalage apparaît plus important que celui attendu uniquement en raison de l'artefact décrit ci-dessus (un peu plus de 500 nm contre approximativement 200 nm à 2 pN). Il se peut donc que le décalage vu en (a) ne soit pas seulement dû à l'artefact des oscillations.

Plusieurs raisons peuvent alors expliquer ce décalage. Premièrement, il peut exister à basse force un retard à la transmission du couple jusqu'au point de branchement, au profit d'une accumulation de courbures dans la molécule, et donc d'une réduction de l'extension. Un tel phénomène a été introduit de façon théorique par Philip Neslon [224] et peut être provoqué par la présence de courbures initiales dans la molécule. Par ailleurs, dans notre configuration les branches horizontales de la jonction tournent autour de l'axe vertical à une demie fois la vitesse d'enroulement. La friction exercée au cours de cette rotation induit un couple supplémentaire sur la molécule, ce qui pourrait éventuellement expliquer un éventuel flambage des bras verticaux de la jonction (i.e. un début de formation de plectonèmes), ce qui expliquerait également la diminution de l'extension. Ces deux raisons ne sont pas mutuellement exclusives.

En résumé, le couple nécessaire pour faire migrer la jonction en magnésium et en présence de RuvA reste très faible (inférieur au couple de formation des plectonèmes à 0.3 pN (voir paragraphe 5.3.4) : 6.5 pN · nm/rad). Ces expériences illustrent la grande efficacité de RuvA à faciliter la migration de la jonction, même en présence de 10 mM d'ions magnésium.

Si l'on prend ensemble, (i) le fait que la cinétique de migration spontanée de la jonction de Holliday apparaisse corrélée avec la stabilité relative des conformations ouverte et empilée, et (ii) l'effet connu que RuvA reconnaît spécifiquement la jonction de Holliday et s'y fixe en lui imposant une conformation ouverte, alors les résultats présentés ici démontrent que RuvA, de part son rôle structural, est un catalyseur pour l'échange des paires de bases au niveau du point de branchement de la jonction de Holliday.

7.2 RuvA empêche la formation de la jonction de Holliday

Jusqu'ici, les expériences faites en présence de RuvA ont été réalisées en ayant préformé la jonction de Holliday. Il est cependant intéressant d'examiner si la présence de la protéine ne pourrait pas faciliter l'extrusion de la jonction. Pour ce faire, une fois RuvA injecté, le sur-enroulement ΔLk est ramené à une valeur positive afin de résorber complètement la jonction. Quand les plectonèmes positifs apparaissent (et que la jonction a donc été résorbée), on sous-enroule à nouveau la molécule pour tenter d'extruder la jonction.

Tout d'abord, il ressort qu'en présence de RuvA l'extrusion de la jonction n'est pas facilitée, puisque l'on peut sous-enrouler la molécule de plusieurs centaines de tours sans observer de transition équivalentes à celles que l'on peut observer en l'absence de magnésium (données non représentées). Si l'on applique ensuite à la molécule dénaturée la méthode des cycles de baisse et de remontée en force vue précédemment (figure 7.3-a), on constate qu'il est finalement très difficile de former la jonction (pas de formation, même après sept allers-retours).

Pour contrôler qu'il s'agit bien d'un effet de la présence de la protéine, un rinçage de RuvA est effectué en faisant passer 40 μL de tampon à 10 mM d'ions magnésium. On constate alors qu'il est à nouveau possible, en utilisant la méthode des cycles de force, de former la jonction de Holliday (figure 7.3-b).

La présence de RuvA ne facilite donc pas la génération de la jonction. Ce phénomène est probablement dû à l'importante affinité de RuvA pour le simple brin [125] : en se chargeant sur le simple brin formé au cours de l'ouverture des bulles de dénaturation, RuvA peut empêcher le réappariement des simples brins sur eux-même pour former les bras horizontaux de la jonction. Cependant, étant donné qu'un court rinçage suffit à permettre à nouveau l'extrusion de la jonction, cela suggère que la jonction pourrait tout de même se former en présence de RuvA mais à condition d'utiliser une faible concentration de protéine.

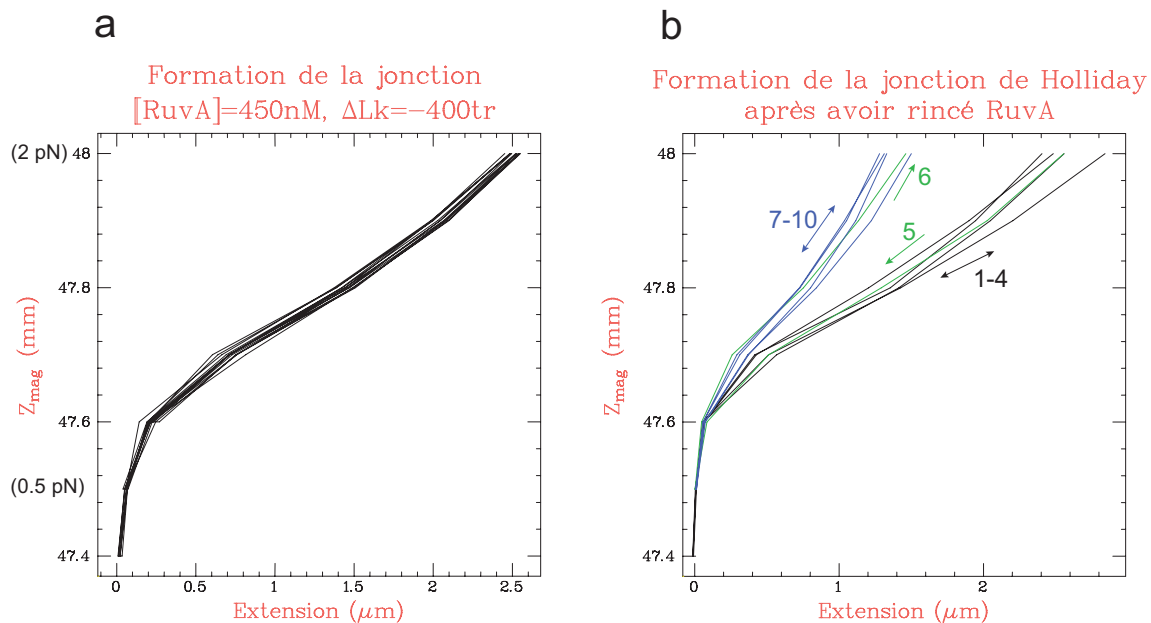


FIGURE 7.3 – *Illustration de la difficulté à former la jonction de Holliday en présence de RuvA. Des cycles de baisse et de remontée de la force sont effectués de la même manière que précédemment (figure 5.4). (a) En présence de 450 nM de RuvA, on ne parvient pas à former la jonction, même après de nombreux cycles (7 allers-retours sont ici effectués). (b) Après rinçage de la protéine avec 40 μL de tampon, on parvient à nouveau, dans les mêmes conditions à former la jonction après seulement 3 allers-retours (ordre des cycles : noir, vert et bleu).*

Conclusions et perspectives

Une partie importante de ce travail de thèse a tout d'abord été consacrée à la mise en place de l'instrument pour la micromanipulation de molécules individuelles : la Pince Magnétique. Un effort important a en particulier été fourni pour le développement de certains aspects de l'instrument : élaboration d'une architecture visant à optimiser la stabilité du montage, développement d'un système microfluidique afin de minimiser les volumes et de pouvoir approcher les aimants au plus près de l'échantillon pour étendre au maximum la gamme de force, installation d'une enceinte et d'une régulation en température pour pouvoir travailler dans un environnement contrôlé. De plus, une analyse approfondie des caractéristiques de l'instrument vis-à-vis de la stabilité et de la précision des mesures a été effectuée. Cette analyse a été accompagnée d'une calibration précise de la mesure du mouvement des billes, notamment la mesure des déplacements verticaux. Un travail important a également été effectué pour optimiser les protocoles de préparation concernant les billes, les surfaces de capillaire et les conditions de mise en place des expériences. Un travail important a également été fourni par mon directeur de thèse François Heslot pour la préparation des constructions d'ADN.

Les expériences de micromanipulation ont permis tout d'abord de montrer qu'il était possible d'extruder mécaniquement une jonction de Holliday en sous-enroulant une molécule d'ADN portant une séquence palindromique. La migration de la jonction peut ensuite être contrôlée directement «à la main» et de façon réversible. Les mesures de variations de l'extension de la molécule en fonction du degré d'extrusion ont permis de déterminer expérimentalement une valeur précise du pas de l'ADN en solution : 3.61 ± 0.03 nm/tr. Ce résultat, qui est une moyenne sur plusieurs milliers de paires de bases, s'écarte de façon significative de la valeur de 3.4 nm/tr trouvée dans les structures cristallographiques d'ADN. Il permet de valider la valeur du pas de l'ADN en solution habituellement utilisée, mais qui, jusqu'à présent, n'avait pas été mesurée de façon précise. Ces expériences permettent par ailleurs de mesurer des modifications de la valeur du pas de l'ADN induites par un intercalant.

La micromanipulation d'une jonction de Holliday a également été réalisée en présence d'ions magnésium. Conformément à ce qui était attendu, la présence d'ions magnésium a un effet important sur le comportement de la structure cruciforme. Tout d'abord l'extrusion de la jonction à partir d'un ADN linéaire palindromique est rendue particulièrement difficile. Par ailleurs, conformément à ce qui avait été observé auparavant par des mesures de diffusion du point de branchement, la cinétique de migration est très fortement

ralentie, même en présence d'une contrainte de torsion suffisamment élevée pour dénaturer l'ADN. Nous avons effectué des mesures de cinétique de migration et étudié l'effet des contraintes mécaniques sur cette cinétique. Une modélisation simple du comportement de la jonction a été développée pour rendre compte de ces effets. Cette modélisation suggère tout d'abord que la force de traction induit stabilisation relative de la conformation ouverte (considérée comme l'état de transition pour un échange de paires de bases) vis-à-vis de la conformation empilée de la jonction. De même il apparaît que la contrainte de torsion influence également la stabilité relative de ces deux conformations. D'autre part, cette modélisation permet également de rendre compte du comportement dissymétrique de la structure vis-à-vis du signe de la contrainte de torsion, conformément au fait que la jonction de Holliday est un objet chiral.

L'étude du complexe RuvAB a permis de commencer à caractériser son fonctionnement à l'échelle d'un complexe individuel. Elle révèle ainsi la grande processivité du complexe une fois celui-ci assemblé sur la jonction. De plus, on a pu obtenir les premières mesures précises de la vitesse d'échange de simples brins induite par la protéine entre molécules d'ADN homologues. Ces premières expériences devront être prolongées pour étudier comment la concentration en ATP, la présence d'ATP γ S ou d'ADP, ou encore la présence d'hétérologies de séquence modifient le comportement de la protéine. De même l'étude de mutants des sous-unités RuvA ou RuvB sera un bon moyen de comprendre le fonctionnement du moteur. Par ailleurs, ces expériences peuvent être étendues à l'étude du comportement de RuvAB en association avec d'autres protéines comme par exemple RuvC ou RecA.

La micro manipulation de jonctions de Holliday individuelles en présence d'ions magnésium a aussi été l'occasion d'étudier individuellement la protéine RuvA et son effet sur le processus de migration. Cette étude a permis de montrer que RuvA, qui impose à la jonction une conformation ouverte plus favorable à la migration, agit aussi comme un catalyseur de l'échange des simples brins, échange qui peut se produire alors beaucoup plus rapidement en présence de la protéine. Par ailleurs l'étude de mutant ou d'analogues de RuvA ne pouvant pas s'assembler en double tétramères permettra de savoir si la jonction doit nécessairement être prise en sandwich pour qu'un complexe stable favorisant la migration puisse se former. Enfin, l'étude de l'effet de RuvC, en présence d'ions calcium qui inhibent son activité nucléase, et en association ou non avec RuvA, pourra aussi être intéressante.

Bibliographie

- [1] Albert L. Lehninger, David L. Nelson, and Michael M. Cox. *Principle of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, seconde edition edition, 1993.
- [2] M. Bansal. Dna structure : Revisiting the watson-crick double helix. *Current Science*, 85(11) :1556–1563, 2003. Curr. Sci.
- [3] J. F. Allemand, D. Bensimon, R. Lavery, and V. Croquette. Stretched and overwound dna forms a pauling-like structure with exposed bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24) :14152–14157, 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [4] R. Holliday. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetical Research*, 5 :282–304, 1964.
- [5] B. J. Thompson, C. Escarmis, B. Parker, W. Christopher, J. Doniger, I. Tessman, and R. C. Warner. Figure-8 configuration of dimers of s13 and phix174 replicative form dna. *Journal of Molecular Biology*, 91(4) :409–?, 1975. J. Mol. Biol.
- [6] M. S. Valenzuela and R. B. Inman. Visualization of a novel junction in bacteriophage-lambda dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(8) :3024–3028, 1975. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [7] A. Schwacha and N. Kleckner. Identification of double holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell*, 83(5) :783–791, 1995. Cell.
- [8] L. Postow, C. Ullsperger, R. W. Keller, C. Bustamante, A. V. Vologodskii, and N. R. Cozzarelli. Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. *Journal of Biological Chemistry*, 276(4) :2790–2796, 2001. J. Biol. Chem.
- [9] D. Dressler and H. Potter. Molecular mechanisms in genetic-recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 51 :727–761, 1982.
- [10] T. R. Broker and I. R. Lehman. Branched dna molecules - intermediates in t4 recombination. *Journal of Molecular Biology*, 60(1) :131–?, 1971. J. Mol. Biol.
- [11] N. Sigal and B. Alberts. Genetic recombination - nature of a crossed strand-exchange between 2 homologous dna molecules. *Journal of Molecular Biology*, 71(3) :789–?, 1972. J. Mol. Biol.
- [12] H. Potter and D. Dressler. Mechanism of genetic-recombination - electron-microscopic observation of recombination intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(9) :3000–3004, 1976. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.

- [13] H. Potter and D. Dressler. Invitro system from escherichia-coli that catalyzes generalized genetic-recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(8) :3698–3702, 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [14] T. L. Orrweaver, J. W. Szostak, and R. J. Rothstein. Yeast transformation - a model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 78(10) :6354–6358, 1981.
- [15] R. Hoess, A. Wierzbicki, and K. Abremski. Isolation and characterization of intermediates in site-specific recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(19) :6840–6844, 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [16] P. A. Kitts and H. A. Nash. Homology-dependent interactions in phage-lambda site-specific recombination. *Nature*, 329(6137) :346–348, 1987. Nature.
- [17] S. E. Nunesduby, L. Matsumoto, and A. Landy. Site-specific recombination intermediates trapped with suicide substrates. *Cell*, 50(5) :779–788, 1987. Cell.
- [18] M. Jayaram, K. L. Crain, R. L. Parsons, and R. M. Harshey. Holliday junctions in flp recombination - resolution by step-arrest mutants of flp protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(21) :7902–7906, 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [19] R. McCulloch, L. W. Coggins, S. D. Colloms, and D. J. Sherratt. Xer-mediated site-specific recombination at cer generates holliday junctions in-vivo. *Embo Journal*, 13(8) :1844–1855, 1994. Embo J.
- [20] G. Mosig. Recombination and recombination-dependent dna replication in bacteriophage t4. *Annual Review of Genetics*, 32 :379–+, 1998. Annu. Rev. Genet.
- [21] G. A. Cromie, J. C. Connelly, and D. R. F. Leach. Recombination at double-strand breaks and dna ends : Conserved mechanisms from phage to humans. *Molecular Cell*, 8(6) :1163–1174, 2001. Mol. Cell.
- [22] D. M. J. Lilley and M. F. White. The junction-resolving enzymes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(6) :433–443, 2001. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.
- [23] M. M. Cox. Historical overview : Searching for replication help in all of the rec places. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15) :8173–8180, 2001. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [24] R. D. Camerini-Otero and P. Hsieh. Homologous recombination proteins in prokaryotes and eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 29 :509–552, 1995. Annu. Rev. Genet.
- [25] S. C. West. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(6) :435–445, 2003. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.
- [26] T. Helleday. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 532(1-2) :103–115, 2003. Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.
- [27] A. Kuzminov. Recombinational repair of dna damage in escherichia coli and bacteriophage lambda. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4) :751–+, 1999. Microbiol. Mol. Biol. Rev.

- [28] S. C. Kowalczykowski, D. A. Dixon, A. K. Eggleston, S. D. Lauder, and W. M. Rehrauer. Biochemistry of homologous recombination in *escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 58(3) :401–465, 1994.
- [29] M. M. Cox. Recombinational dna repair of damaged replication forks in *escherichia coli* : Questions. *Annual Review of Genetics*, 35 :53–82, 2001. Annu. Rev. Genet.
- [30] S. C. Kowalczykowski. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(4) :156–165, 2000. Trends Biochem.Sci.
- [31] K. N. Kreuzer. Recombination-dependent dna replication in phage t4. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(4) :165–173, 2000. Trends Biochem.Sci.
- [32] B. Michel. Replication fork arrest and dna recombination. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(4) :173–178, 2000. Trends Biochem.Sci.
- [33] E. Egelman. A common structural core in proteins active in dna recombination and replication. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(4) :180–181, 2000. Trends Biochem.Sci.
- [34] E. Egelman. A ubiquitous structural core. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(4) :183–184, 2000. Trends Biochem.Sci.
- [35] K. J. Marians. Pri-a-directed replication fork restart in *escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(4) :185–189, 2000. Trends Biochem.Sci.
- [36] M. F. Goodman. Coping with replication 'train wrecks' in *escherichia coli* using pol v, pol ii and reca proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(4) :189–195, 2000. Trends Biochem.Sci.
- [37] H. Flores-Rozas and R. D. Kolodner. Links between replication, recombination and genome instability in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(4) :196–200, 2000. Trends Biochem.Sci.
- [38] A. Kass-Eisler and C. W. Greider. Recombination in telomere-length maintenance. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(4) :200–206, 2000. Trends Biochem.Sci.
- [39] D. M. J. Lilley. Structures of helical junctions in nucleic acids. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 33(2) :109–159, 2000. Q. Rev. Biophys.
- [40] N. C. Seeman and N. R. Kallenbach. Design of immobile nucleic-acid junctions. *Biophysical Journal*, 44(2) :201–209, 1983. Biophys. J.
- [41] N. R. Kallenbach, R. I. Ma, and N. C. Seeman. An immobile nucleic-acid junction constructed from oligonucleotides. *Nature*, 305(5937) :829–831, 1983. Nature.
- [42] D. R. Duckett, A. I. H. Murchie, S. Diekmann, E. Vonkitzing, B. Kemper, and D. M. J. Lilley. The structure of the holliday junction, and its resolution. *Cell*, 55(1) :79–89, 1988. Cell.
- [43] D. R. Duckett and D. M. J. Lilley. Effects of base mismatches on the structure of the 4-way dna junction. *Journal of Molecular Biology*, 221(1) :147–161, 1991. J. Mol. Biol.
- [44] J. R. G. Pohler, D. R. Duckett, and D. M. J. Lilley. Structure of 4-way dna junctions containing a nick in one strand. *Journal of Molecular Biology*, 238(1) :62–74, 1994. J. Mol. Biol.

- [45] R. J. Grainger, A. I. H. Murchie, and D. M. J. Lilley. Exchange between stacking conformers in a four-way dna junction. *Biochemistry*, 37(1) :23–32, 1998. *Biochemistry*.
- [46] A. I. H. Murchie, R. M. Clegg, E. Vonkitzing, D. R. Duckett, S. Diekmann, and D. M. J. Lilley. Fluorescence energy-transfer shows that the 4-way dna junction is a right-handed cross of antiparallel molecules. *Nature*, 341(6244) :763–766, 1989. *Nature*.
- [47] R. M. Clegg, A. I. H. Murchie, A. Zechel, C. Carlberg, S. Diekmann, and D. M. J. Lilley. Fluorescence resonance energy-transfer analysis of the structure of the 4-way dna junction. *Biochemistry*, 31(20) :4846–4856, 1992. *Biochemistry*.
- [48] S. M. Miick, R. S. Fee, D. P. Millar, and W. J. Chazin. Crossover isomer bias is the primary sequence-dependent property of immobilized holliday junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(17) :9080–9084, 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- [49] S. A. McKinney, A. C. Declais, D. M. J. Lilley, and T. Ha. Structural dynamics of individual holliday junctions. *Nature Structural Biology*, 10(2) :93–97, 2003. *Nat. Struct. Biol.*
- [50] J. H. Chen, M. E. A. Churchill, T. D. Tullius, N. R. Kallenbach, and N. C. Seeman. Construction and analysis of monomobile dna junctions. *Biochemistry*, 27(16) :6032–6038, 1988. *Biochemistry*.
- [51] M. E. A. Churchill, T. D. Tullius, N. R. Kallenbach, and N. C. Seeman. A holliday recombination intermediate is twofold symmetric. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(13) :4653–4656, 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- [52] X. J. Li, H. Wang, and N. C. Seeman. Direct evidence for holliday junction crossover isomerization. *Biochemistry*, 36(14) :4240–4247, 1997. *Biochemistry*.
- [53] J. P. Cooper and P. J. Hagerman. Geometry of a branched dna-structure in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(19) :7336–7340, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- [54] G. Carlstrom and W. J. Chazin. Sequence dependence and direct measurement of crossover isomer distribution in model holliday junctions using nmr spectroscopy. *Biochemistry*, 35(11) :3534–3544, 1996. *Biochemistry*.
- [55] F. J. J. Overmars and C. Altona. Nmr study of the exchange rate between two stacked conformers of a model holliday junction. *Journal of Molecular Biology*, 273(3) :519–524, 1997. *J. Mol. Biol.*
- [56] A. I. H. Murchie, J. Portugal, and D. M. J. Lilley. Cleavage of a 4-way dna junction by a restriction enzyme spanning the point of strand exchange. *Embo Journal*, 10(3) :713–718, 1991. *Embo J.*
- [57] J. Nowakowski, P. J. Shim, G. S. Prasad, C. D. Stout, and G. F. Joyce. Crystal structure of an 82-nucleotide rna-dna complex formed by the 10-23 dna enzyme. *Nature Structural Biology*, 6(2) :151–156, 1999. *Nat. Struct. Biol.*
- [58] M. Ortiz-Lombardia, A. Gonzalez, R. Eritja, J. Aymami, F. Azorin, and M. Coll. Crystal structure of a dna holliday junction. *Nature Structural Biology*, 6(10) :913–917, 1999. *Nat. Struct. Biol.*

- [59] B. F. Eichman, J. M. Vargason, B. H. M. Mooers, and P. S. Ho. The holliday junction in an inverted repeat dna sequence : Sequence effects on the structure of four-way junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8) :3971–3976, 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [60] E. Vonkitzing, D. M. J. Lilley, and S. Diekmann. The stereochemistry of a 4-way dna junction - a theoretical-study. *Nucleic Acids Research*, 18(9) :2671–2683, 1990. Nucleic Acids Res.
- [61] C. D. Mao, W. Q. Sun, and N. C. Seeman. Designed two-dimensional dna holliday junction arrays visualized by atomic force microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 121(23) :5437–5443, 1999. J. Am. Chem. Soc.
- [62] P. S. Eis and D. P. Millar. Conformational distributions of a 4-way dna junction revealed by time-resolved fluorescence resonance energy-transfer. *Biochemistry*, 32(50) :13852–13860, 1993. Biochemistry.
- [63] A. R. Srinivasan and W. K. Olson. Computer-models of dna 4-way junctions. *Biochemistry*, 33(32) :9389–9404, 1994. Biochemistry.
- [64] A. Kimball, Q. Guo, M. Lu, R. P. Cunningham, N. R. Kallenbach, N. C. Seeman, and T. D. Tullius. Construction and analysis of parallel and antiparallel holliday junctions. *Journal of Biological Chemistry*, 265(12) :6544–6547, 1990. J. Biol. Chem.
- [65] M. Lu, Q. Guo, N. C. Seeman, and N. R. Kallenbach. Parallel and antiparallel holliday junctions differ in structure and stability. *Journal of Molecular Biology*, 221(4) :1419–1432, 1991. J. Mol. Biol.
- [66] T. J. Fu and N. C. Seeman. Dna double-crossover molecules. *Biochemistry*, 32(13) :3211–3220, 1993. Biochemistry.
- [67] D. R. Duckett, A. I. H. Murchie, and D. M. J. Lilley. The role of metal-ions in the conformation of the 4-way dna junction. *Embo Journal*, 9(2) :583–590, 1990. Embo J.
- [68] R. M. Clegg, A. I. H. Murchie, and D. M. J. Lilley. The solution structure of the 4-way dna junction at low-salt conditions - a fluorescence resonance energy-transfer analysis. *Biophysical Journal*, 66(1) :99–109, 1994. Biophys. J.
- [69] N. E. Mollegaard, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, and P. E. Nielsen. Uranyl photoprobing of a 4-way dna junction - evidence for specific metal-ion binding. *Embo Journal*, 13(7) :1508–1513, 1994. Embo J.
- [70] M. C. Olmsted and P. J. Hagerman. Excess counterion accumulation around branched nucleic-acids. *Journal of Molecular Biology*, 243(5) :919–929, 1994. J. Mol. Biol.
- [71] J. A. Pikkemaat, F. J. J. Overmars, C. M. DreefTromp, H. vandenElst, J. H. vanBoom, and C. Altona. Conformational aspects of an uncharged phosphate analogon built in at the branch-point of a dna four-way junction. *Journal of Molecular Biology*, 262(3) :349–357, 1996. J. Mol. Biol.
- [72] M. O. Fenley, G. S. Manning, N. L. Marky, and W. K. Olson. Excess counterion binding and ionic stability of kinked and branched dna. *Biophysical Chemistry*, 74(2) :135–152, 1998. Biophys. Chem.

- [73] B. N. M. van Buuren, J. Schleucher, and S. S. Wijmenga. Nmr structural studies on a dna four-way junction : Stacking preference and localization of the metal-ion binding site. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, pages 237–243, 2000. J. Biomol. Struct. Dyn.
- [74] R. M. Benbow, A. J. Zuccarelli, and R. L. Sinsheimer. Recombinant dna-molecules of bacteriophage-phix174. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1) :235–239, 1975. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [75] C. S. Lee, R. W. Davis, and N. Davidson. A physical study by electron microscopy of terminally repetitious, circularly permuted dna from coliphage particles of escherichia-coli 15. *Journal of Molecular Biology*, 48(1) :1–?, 1970. J. Mol. Biol.
- [76] M. Meselson. Formation of hybrid dna by rotary diffusion during genetic recombination. *Journal of Molecular Biology*, 71(3) :795–?, 1972. J. Mol. Biol.
- [77] B. J. Thompson, M. N. Camien, and R. C. Warner. Kinetics of branch migration in double-stranded dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7) :2299–2303, 1976. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [78] R. C. Warner, R. A. Fishel, and F. C. Wheeler. Branch migration in recombination. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 43 :957–968, 1978. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
- [79] I. G. Panyutin and P. Hsieh. Formation of a single base mismatch impedes spontaneous dna branch migration. *Journal of Molecular Biology*, 230(2) :413–424, 1993. J. Mol. Biol.
- [80] I. G. Panyutin and P. Hsieh. The kinetics of spontaneous dna branch migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6) :2021–2025, 1994.
- [81] I. G. Panyutin, I. Biswas, and P. Hsieh. A pivotal role for the structure of the holliday junction in dna branch migration. *Embo Journal*, 14(8) :1819–1826, 1995. Embo J.
- [82] R. D. Johnson and L. S. Symington. Crossed-stranded dna structures for investigating the molecular-dynamics of the holliday junction. *Journal of Molecular Biology*, 229(4) :812–820, 1993. J. Mol. Biol.
- [83] S. B. Mulrooney, R. A. Fishel, J. A. Hejna, and R. C. Warner. Preparation of figure 8 and cruciform dnas and their use in studies of the kinetics of branch migration. *Journal of Biological Chemistry*, 271(16) :9648–9659, 1996. J. Biol. Chem.
- [84] M. Gellert, M. H. Odea, and K. Mizuuchi. Slow cruciform transitions in palindromic dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 80(18) :5545–5549, 1983.
- [85] I. Biswas, A. Yamamoto, and P. Hsieh. Branch migration through dna sequence heterology. *Journal of Molecular Biology*, 279(4) :795–806, 1998.
- [86] C. Joo, S. A. McKinney, D. M. J. Lilley, and T. Ha. Exploring rare conformational species and ionic effects in dna holliday junctions using single-molecule spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 341(3) :739–751, 2004. J. Mol. Biol.
- [87] J. SantaLucia. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide dna nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 95(4) :1460–1465, 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [88] M. C. Whitby, L. Ryder, and R. G. Lloyd. Reverse branch migration of holliday junctions by recg protein - a new mechanism for resolution of intermediates in recombination and dna-repair. *Cell*, 75(2) :341–350, 1993. Cell.
 - [89] R. G. Lloyd and G. J. Sharples. Processing of recombination intermediates by the recg and ruvab proteins of escherichia-coli. *Nucleic Acids Research*, 21(8) :1719–1725, 1993. Nucleic Acids Res.
 - [90] R. G. Lloyd and G. J. Sharples. Dissociation of synthetic holliday junctions by escherichia-coli recg protein. *Embo Journal*, 12(1) :17–22, 1993. Embo J.
 - [91] B. Muller, P. E. Boehmer, P. T. Emmerson, and S. C. West. Action of recbcd enzyme on holliday structures made by reca. *Journal of Biological Chemistry*, 266(28) :19028–19033, 1991. J. Biol. Chem.
 - [92] S. C. West. The ruvabc proteins and holliday junction processing in escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 178(5) :1237–1241, 1996.
 - [93] G. J. Sharples, S. M. Ingleston, and R. G. Lloyd. Holliday junction processing in bacteria : Insights from the evolutionary conservation of ruvabc, recg, and rusa. *Journal of Bacteriology*, 181(18) :5543–5550, 1999. J. Bacteriol.
 - [94] R. G. Lloyd. Conjugational recombination in resolvase-deficient ruvc mutants of escherichia-coli k-12 depends on recg. *Journal of Bacteriology*, 173(17) :5414–5418, 1991. J. Bacteriol.
 - [95] S. C. West. Processing of recombination intermediates by the ruvabc proteins. *Annual Review of Genetics*, 31 :213–244, 1997.
 - [96] N. Otsuji, H. Iyehara, and Hideshim.Y. Isolation and characterization of an escherichia-coli-ruv mutant which forms nonseptate filaments after low-doses of ultraviolet-light irradiation. *Journal of Bacteriology*, 117(2) :337–344, 1974. J. Bacteriol.
 - [97] R. G. Lloyd, F. E. Benson, and C. E. Shurvinton. Effect of ruv mutations on recombination and dna-repair in escherichia-coli-k12. *Molecular & General Genetics*, 194(1-2) :303–309, 1984. Mol. Gen. Genet.
 - [98] F. Benson, S. Collier, and R. G. Lloyd. Evidence of abortive recombination in ruv mutants of escherichia-coli-k12. *Molecular & General Genetics*, 225(2) :266–272, 1991. Mol. Gen. Genet.
 - [99] G. J. Sharples, F. E. Benson, G. T. Illing, and R. G. Lloyd. Molecular and functional-analysis of the ruv region of escherichia-coli k-12 reveals 3 genes involved in dna-repair and recombination. *Molecular & General Genetics*, 221(2) :219–226, 1990. Mol. Gen. Genet.
 - [100] M. Takahagi, H. Iwasaki, A. Nakata, and H. Shinagawa. Molecular analysis of the escherichia-coli ruvc gene, which encodes a holliday junction-specific endonuclease. *Journal of Bacteriology*, 173(18) :5747–5753, 1991. J. Bacteriol.
 - [101] T. Miyata, K. Yamada, H. Iwasaki, H. Shinagawa, K. Morikawa, and K. Mayanagi. Two different oligomeric states of the ruvb branch migration motor protein as revealed by electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, 131(2) :83–89, 2000. J. Struct. Biol.

- [102] T. Ohnishi, H. Iwasaki, Y. Ishino, S. Kuramitsu, A. Nakata, and H. Shinagawa. Identification and characterization of thermus thermophilus hb8 ruva protein, the subunit of the ruvab protein complex that promotes branch migration of holliday junctions. *Genes & Genetic Systems*, 75(5) :233–243, 2000. Genes Genet. Syst.
- [103] K. Yamada, N. Kunishima, K. Mayanagi, T. Ohnishi, T. Nishino, H. Iwasaki, H. Shinagawa, and K. Morikawa. Crystal structure of the holliday junction migration motor protein ruvb from thermus thermophilus hb8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4) :1442–1447, 2001. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [104] J. Arenas-Licea, A. J. van Gool, A. J. Keeley, A. Davies, S. C. West, and I. R. Tsaneva. Functional interactions of mycobacterium leprae ruva with escherichia coli ruvb and ruvc on holliday junctions. *Journal of Molecular Biology*, 301(4) :839–850, 2000. J. Mol. Biol.
- [105] S. M. Ingleston, M. J. Dickman, J. A. Grasby, D. P. Hornby, G. J. Sharples, and R. G. Lloyd. Holliday junction binding and processing by the ruva protein of mycoplasma pneumoniae. *European Journal of Biochemistry*, 269(5) :1525–1533, 2002. Eur. J. Biochem.
- [106] T. Hishida, H. Iwasaki, K. Ishioka, and H. Shinagawa. Molecular analysis of the pseudomonas aeruginosa genes, ruva, ruvb and ruvc, involved in processing of homologous recombination intermediates. *Gene*, 182(1-2) :63–70, 1996. Gene.
- [107] C. E. Shurvinton and R. G. Lloyd. Damage to dna induces expression of the ruv gene of escherichia-coli. *Molecular & General Genetics*, 185(2) :352–355, 1982. Mol. Gen. Genet.
- [108] F. E. Benson, G. T. Illing, G. J. Sharples, and R. G. Lloyd. Nucleotide sequencing of the ruv region of escherichia-coli k-12 reveals a lexa regulated operon encoding 2 genes. *Nucleic Acids Research*, 16(4) :1541–1549, 1988. Nucleic Acids Res.
- [109] H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, S. Kimura, H. Iwasaki, and A. Nakata. Structure and regulation of the escherichia-coli ruv operon involved in dna-repair and recombination. *Journal of Bacteriology*, 170(9) :4322–4329, 1988. J. Bacteriol.
- [110] G. J. Sharples and R. G. Lloyd. Resolution of holliday junctions in escherichia-coli - identification of the ruvc gene-product as a 19-kilodalton protein. *Journal of Bacteriology*, 173(23) :7711–7715, 1991. J. Bacteriol.
- [111] S. C. West and B. Connolly. Biological roles of the escherichia-coli ruva, ruvb and ruvc proteins revealed. *Molecular Microbiology*, 6(19) :2755–2759, 1992. Mol. Microbiol.
- [112] S. C. West. Enzymes and molecular mechanisms of genetic-recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 61 :603–640, 1992. Annu. Rev. Biochem.
- [113] I. R. Tsaneva, G. Illing, R. G. Lloyd, and S. C. West. Purification and properties of the ruva and ruvb proteins of escherichia-coli. *Molecular & General Genetics*, 235(1) :1–10, 1992.
- [114] K. Ishioka, A. Fukuoh, H. Iwasaki, A. Nakata, and H. Shinagawa. Abortive recombination in escherichia coli ruv mutants blocks chromosome partitioning. *Genes to Cells*, 3(4) :209–220, 1998. Genes Cells.

- [115] B. Michel, G. Grompone, M. J. Flores, and V. Bidnenko. Multiple pathways process stalled replication forks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35) :12783–12788, 2004. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [116] B. Muller and S. C. West. Processing of holliday junctions by the escherichia-coli ruva, ruvb, ruvc and recg proteins. *Experientia*, 50(3) :216–222, 1994. Experientia.
- [117] T. Asai and T. Kogoma. Roles of ruva, ruvc and recg gene functions in normal and dna damage-inducible replication of the escherichia-coli chromosome. *Genetics*, 137(4) :895–902, 1994. Genetics.
- [118] J. R. Donaldson, C. T. Courcelle, and J. Courcelle. Ruvab and recg are not essential for the recovery of dna synthesis following uv-induced dna damage in escherichia coli. *Genetics*, 166(4) :1631–1640, 2004. Genetics.
- [119] J. B. Rafferty, S. E. Sedelnikova, D. Hargreaves, P. J. Artymiuk, P. J. Baker, G. J. Sharples, A. A. Mahdi, R. G. Lloyd, and D. W. Rice. Crystal structure of dna recombination protein ruva and a model for its binding to the holliday junction. *Science*, 274(5286) :415–421, 1996. Science.
- [120] T. Shiba, H. Iwasaki, A. Nakata, and H. Shinagawa. Escherichia-coli ruva and ruvb proteins involved in recombination repair - physical-properties and interactions with dna. *Molecular & General Genetics*, 237(3) :395–399, 1993. Mol. Gen. Genet.
- [121] S. M. Ingleston, G. J. Sharples, and R. G. Lloyd. The acidic pin of ruva modulates holliday junction binding and processing by the ruvabc resolvasome. *Embo Journal*, 19(22) :6266–6274, 2000. Embo J.
- [122] S. M. Roe, T. Barlow, T. Brown, M. Oram, A. Keeley, I. R. Tsaneva, and L. H. Pearl. Crystal structure of an octameric ruva-holliday junction complex. *Molecular Cell*, 2(3) :361–372, 1998.
- [123] M. Ariyoshi, T. Nishino, H. Iwasaki, H. Shinagawa, and K. Morikawa. Crystal structure of the holliday junction dna in complex with a single ruva tetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15) :8257–8262, 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [124] D. Hargreaves, D. W. Rice, S. E. Sedelnikova, P. J. Artymiuk, R. G. Lloyd, and J. B. Rafferty. Crystal structure of e-coli ruva with bound dna holliday junction at 6 angstrom resolution. *Nature Structural Biology*, 5(6) :441–446, 1998.
- [125] T. Shiba, H. Iwasaki, A. Nakata, and H. Shinagawa. Sos-inducible dna-repair proteins, ruva and ruvb, of escherichia-coli - functional interactions between ruva and ruvb for atp hydrolysis and renaturation of the cruciform structure in supercoiled dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(19) :8445–8449, 1991.
- [126] C. A. Parsons and S. C. West. Formation of a ruvab-holliday junction complex in-vitro. *Journal of Molecular Biology*, 232(2) :397–405, 1993. J. Mol. Biol.
- [127] H. Iwasaki, M. Takahagi, A. Nakata, and H. Shinagawa. Escherichia-coli ruva-protein and ruvb-protein specifically interact with holliday junctions and promote branch migration. *Genes & Development*, 6(11) :2214–2220, 1992.
- [128] C. A. Parsons, I. Tsaneva, R. G. Lloyd, and S. C. West. Interaction of escherichia-coli ruva and ruvb proteins with synthetic holliday junctions.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12) :5452–5456, 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [129] D. Chamberlain, A. Keeley, M. Aslam, J. Arenas-Licea, T. Brown, I. R. Tsaneva, and S. J. Perkins. A synthetic holliday junction is sandwiched between two tetrameric mycobacterium leprae ruva structures in solution : New insights from neutron scattering contrast variation and modelling. *Journal of Molecular Biology*, 284(2) :385–400, 1998. J. Mol. Biol.
- [130] C. A. Parsons, A. Stasiak, R. J. Bennett, and S. C. West. Structure of a multisubunit complex that promotes dna branch migration. *Nature*, 374(6520) :375–378, 1995.
- [131] T. Nishino, M. Ariyoshi, H. Iwasaki, H. Shinagawa, and K. Morikawa. Functional analyses of the domain structure in the holliday junction binding protein ruva. *Structure*, 6(1) :11–21, 1998. Structure.
- [132] M. C. Whitby, E. L. Bolt, S. N. Chan, and R. G. Lloyd. Interactions between ruva and ruvc at holliday junctions : Inhibition of junction cleavage and formation of a ruva-ruvc-dna complex. *Journal of Molecular Biology*, 264(5) :878–890, 1996. J. Mol. Biol.
- [133] B. Muller, I. R. Tsaneva, and S. C. West. Branch migration of holliday junctions promoted by the escherichia-coli ruva and ruvb proteins .2. interaction of ruvb with dna. *Journal of Biological Chemistry*, 268(23) :17185–17189, 1993. J. Biol. Chem.
- [134] M. J. Dickman, S. M. Ingleston, S. E. Sedelnikova, J. B. Rafferty, R. G. Lloyd, J. A. Grasby, and D. P. Hornby. The ruvabc resolvasome - quantitative analysis of ruva and ruvc assembly on junction dna. *European Journal of Biochemistry*, 269(22) :5492–5501, 2002.
- [135] H. Iwasaki, T. Shiba, K. Makino, A. Nakata, and H. Shinagawa. Overproduction, purification, and atpase activity of the escherichia-coli ruvb protein involved in dna-repair. *Journal of Bacteriology*, 171(10) :5276–5280, 1989. J. Bacteriol.
- [136] Y. J. Chen, X. Yu, and E. H. Egelman. The hexameric ring structure of the escherichia coli ruvb branch migration protein. *Journal of Molecular Biology*, 319(3) :587–591, 2002. J. Mol. Biol.
- [137] A. H. Mitchell and S. C. West. Hexameric rings of escherichia-coli ruvb protein - cooperative assembly, processivity and atpase activity. *Journal of Molecular Biology*, 243(2) :208–215, 1994.
- [138] A. Stasiak, I. R. Tsaneva, S. C. West, C. J. B. Benson, X. Yu, and E. H. Egelman. The escherichia-coli ruvb branch migration protein forms double hexameric rings around dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16) :7618–7622, 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [139] H. Shinagawa, T. Shiba, H. Iwasaki, K. Makino, M. Takahagi, and A. Nakata. Properties of the escherichia-coli ruva and ruvb proteins involved in dna-repair, recombination and mutagenesis. *Biochimie*, 73(4) :505–507, 1991. Biochimie.
- [140] S. S. Patel and K. M. Picha. Structure and function of hexameric helicases. *Annual Review of Biochemistry*, 69 :651–697, 2000. Annu. Rev. Biochem.

- [141] I. R. Tsaneva, B. Muller, and S. C. West. Ruva and ruvb proteins of escherichia-coli exhibit dna helicase activity invitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(4) :1315–1319, 1993.
- [142] H. George, I. Kuraoka, D. A. Nauman, W. R. Kobertz, R. D. Wood, and S. C. West. Ruvab-mediated branch migration does not involve extensive dna opening within the ruvb hexamer. *Current Biology*, 10(2) :103–106, 2000. *Curr. Biol.*
- [143] A. E. Gorbalenya and E. V. Koonin. Helicases - amino-acid-sequence comparisons and structure-function-relationships. *Current Opinion in Structural Biology*, 3(3) :419–429, 1993. *Curr. Opin. Struct. Biol.*
- [144] M. C. Sanmartin, N. P. J. Stamford, N. Dammerova, N. E. Dixon, and J. M. Carazo. A structural model for the escherichia-coli dnab helicase based on electron-microscopy data. *Journal of Structural Biology*, 114(3) :167–176, 1995. *J. Struct. Biol.*
- [145] J. Geiselmann, T. D. Yager, S. C. Gill, P. Calmettes, and P. H. Vonhippel. Physical-properties of the escherichia-coli transcription termination factor rho .1. association states and geometry of the rho hexamer. *Biochemistry*, 31(1) :111–121, 1992. *Biochemistry*.
- [146] X. Yu, M. M. Hingorani, S. S. Patel, and E. H. Egelman. Dna is bound within the central hole to one or two of the six subunits of the t7 dna helicase. *Nature Structural Biology*, 3(9) :740–743, 1996. *Nat. Struct. Biol.*
- [147] F. Dong, E. P. Gogol, and P. H. Vonhippel. The phage t4-coded dna-replication helicase (gp41) forms a hexamer upon activation by nucleoside triphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 270(13) :7462–7473, 1995. *J. Biol. Chem.*
- [148] E. T. Fouts, X. Yu, E. H. Egelman, and M. R. Botchan. Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric e1 helicase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(7) :4447–4458, 1999. *J. Biol. Chem.*
- [149] F. B. Dean, J. A. Borowiec, T. Eki, and J. Hurwitz. The simian virus-40 t-antigen double hexamer assembles around the dna at the replication origin. *Journal of Biological Chemistry*, 267(20) :14129–14137, 1992. *J. Biol. Chem.*
- [150] A. F. Neuwald, L. Aravind, J. L. Spouge, and E. V. Koonin. Aaa(+) : A class of chaperone-like atpases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Research*, 9(1) :27–43, 1999. *Genome Res.*
- [151] C. D. Putnam, S. B. Clancy, H. Tsuruta, S. Gonzalez, J. G. Wetmur, and J. A. Tainer. Structure and mechanism of the ruvb holliday junction branch migration motor. *Journal of Molecular Biology*, 311(2) :297–310, 2001. *J. Mol. Biol.*
- [152] H. Iwasaki, Y. W. Han, T. Okamoto, T. Ohnishi, M. Yoshikawa, K. Yamada, T. Toh, H. Daiyasu, T. Ogura, and H. Shinagawa. Mutational analysis of the functional motifs of ruvb, an aaa(+) class helicase and motor protein for holliday junction branch migration. *Molecular Microbiology*, 36(3) :528–538, 2000. *Mol. Microbiol.*
- [153] S. Patel and M. Latterich. The aaa team : related atpases with diverse functions. *Trends in Cell Biology*, 8(2) :65–71, 1998. *Trends Cell Biol.*
- [154] B. Muller, I. R. Tsaneva, and S. C. West. Branch migration of holliday junctions promoted by the escherichia-coli ruva and ruvb proteins .1. comparison of

- ruvab-mediated and ruvb-mediated reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 268(23) :17179–17184, 1993. J. Biol. Chem.
- [155] I. R. Tsaneva and S. C. West. Targeted versus non-targeted dna helicase activity of the ruva and ruvb proteins of escherichia-coli. *Journal of Biological Chemistry*, 269(42) :26552–26558, 1994. J. Biol. Chem.
- [156] I. R. Tsaneva, B. Muller, and S. C. West. Atp-dependent branch migration of holliday junctions promoted by the ruva and ruvb proteins of escherichia-coli. *Cell*, 69(7) :1171–1180, 1992.
- [157] K. Hiom and S. C. West. Characterization of ruvab-holliday junction complexes by glycerol gradient sedimentation. *Nucleic Acids Research*, 23(18) :3621–3626, 1995. Nucleic Acids Res.
- [158] A. H. Mitchell and S. C. West. Role of ruva in branch migration reactions catalyzed by the ruva and ruvb proteins of escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 271(32) :19497–19502, 1996.
- [159] K. Hiom and S. C. West. Branch migration during homologous recombination - assembly of a ruvab-holliday junction complex in-vitro. *Cell*, 80(5) :787–793, 1995. Cell.
- [160] X. Yu, S. C. West, and E. H. Egelman. Structure and subunit composition of the ruvab-holliday junction complex. *Journal of Molecular Biology*, 266(2) :217–222, 1997.
- [161] A. J. van Gool, N. M. A. Hajibagheri, A. Stasiak, and S. C. West. Assembly of the escherichia coli ruvabc resolvasome directs the orientation of holliday junction resolution. *Genes & Development*, 13(14) :1861–1870, 1999.
- [162] S. C. West. Ruva gets x-rayed on holliday. *Cell*, 94(6) :699–701, 1998.
- [163] K. Yamada, T. Miyata, D. Tsuchiya, T. Oyama, Y. Fujiwara, T. Ohnishi, H. Iwasaki, H. Shinagawa, M. Ariyoshi, K. Mayanagi, and K. Morikawa. Crystal structure of the ruva-ruvb complex : A structural basis for the holliday junction migrating motor machinery. *Molecular Cell*, 10(3) :671–681, 2002. Mol. Cell.
- [164] T. Nishino, H. Iwasaki, M. Kataoka, M. Ariyoshi, T. Fujita, H. Shinagawa, and K. Morikawa. Modulation of ruvb function by the mobile domain iii of the holliday junction recognition protein ruva. *Journal of Molecular Biology*, 298(3) :407–416, 2000. J. Mol. Biol.
- [165] K. Hiom, I. R. Tsaneva, and S. C. West. The directionality of ruvab-mediated branch migration : In vitro studies with three-armed junctions. *Genes to Cells*, 1(5) :443–451, 1996. Genes Cells.
- [166] A. K. Eggleston, A. H. Mitchell, and S. C. West. In vitro reconstitution of the late steps of genetic recombination in e-coli. *Cell*, 89(4) :607–617, 1997. Cell.
- [167] C. Dennis, A. Fedorov, E. Kas, L. Salome, and M. Grigoriev. Ruvab-directed branch migration of individual holliday junctions is impeded by sequence. *Embo Journal*, 23(12) :2413–2422, 2004. Embo J.
- [168] C. A. Parsons, A. Stasiak, and S. C. West. The escherichia-coli ruvab proteins branch migrate holliday junctions through heterologous dna-sequences in a reaction facilitated by ssb. *Embo Journal*, 14(22) :5736–5744, 1995. Embo J.

- [169] L. E. Iype, R. B. Inman, and M. M. Cox. Blocked recA protein-mediated dna strand exchange-reactions are reversed by the ruvA and ruvB proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 270(33) :19473–19480, 1995. J. Biol. Chem.
- [170] L. E. Iype, E. A. Wood, R. B. Inman, and M. M. Cox. RuvA and ruvB proteins facilitate the bypass of heterologous dna insertions during recA protein-mediated dna strand exchange. *Journal of Biological Chemistry*, 269(40) :24967–24978, 1994. J. Biol. Chem.
- [171] D. E. Adams and S. C. West. Bypass of dna heterologies during ruvAB-mediated three- and four-strand branch migration. *Journal of Molecular Biology*, 263(4) :582–596, 1996. J. Mol. Biol.
- [172] H. Shinagawa and H. Iwasaki. Processing the holliday junction in homologous recombination. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(3) :107–111, 1996.
- [173] H. J. Dunderdale, G. J. Sharples, R. G. Lloyd, and S. C. West. Cloning, overexpression, purification, and characterization of the escherichia-coli ruvC holliday junction resolvase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(7) :5187–5194, 1994. J. Biol. Chem.
- [174] H. J. Dunderdale, F. E. Benson, C. A. Parsons, G. J. Sharples, R. G. Lloyd, and S. C. West. Formation and resolution of recombination intermediates by escherichia-coli recA and ruvC proteins. *Nature*, 354(6354) :506–510, 1991. Nature.
- [175] H. Iwasaki, M. Takahagi, T. Shiba, A. Nakata, and H. Shinagawa. Escherichia-coli ruvC protein is an endonuclease that resolves the holliday structure. *Embo Journal*, 10(13) :4381–4389, 1991. Embo J.
- [176] B. Connolly, C. A. Parsons, F. E. Benson, H. J. Dunderdale, G. J. Sharples, R. G. Lloyd, and S. C. West. Resolution of holliday junctions invitro requires the escherichia-coli ruvC gene-product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(14) :6063–6067, 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [177] R. J. Bennett and S. C. West. Resolution of holliday junctions in genetic recombination : RuvC protein nicks dna at the point of strand exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22) :12217–12222, 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [178] R. J. Bennett, H. J. Dunderdale, and S. C. West. Resolution of holliday junctions by ruvC resolvase - cleavage specificity and dna distortion. *Cell*, 74(6) :1021–1031, 1993. Cell.
- [179] M. Takahagi, H. Iwasaki, and H. Shinagawa. Structural requirements of substrate dna for binding to and cleavage by ruvC, a holliday junction resolvase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(21) :15132–15139, 1994. J. Biol. Chem.
- [180] R. Shah, R. J. Bennett, and S. C. West. Activation of ruvC holliday junction resolvase in-vitro. *Nucleic Acids Research*, 22(13) :2490–2497, 1994. Nucleic Acids Res.
- [181] T. Shida, H. Iwasaki, A. Saito, Y. Kyogoku, and H. Shinagawa. Analysis of substrate specificity of the ruvC holliday junction resolvase with synthetic holliday junctions. *Journal of Biological Chemistry*, 271(42) :26105–26109, 1996. J. Biol. Chem.

- [182] R. Shah, R. J. Bennett, and S. C. West. Genetic-recombination in escherichia-coli - ruvc protein cleaves holliday junctions at resolution hotspots in-vitro. *Cell*, 79(5) :853–864, 1994. Cell.
- [183] M. Ariyoshi, D. G. Vassilyev, H. Iwasaki, H. Nakamura, H. Shinagawa, and K. Morikawa. Atomic-structure of the ruvc resolvase - a holliday junction-specific endonuclease from escherichia-coli. *Cell*, 78(6) :1063–1072, 1994. Cell.
- [184] M. Yoshikawa, H. Iwasaki, and H. Shinagawa. Evidence that phenylalanine 69 in escherichia coli ruvc resolvase forms a stacking interaction during binding and destabilization of a holliday junction dna substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13) :10432–10436, 2001. J. Biol. Chem.
- [185] R. J. Bennett and S. C. West. Structural-analysis of the ruvc-holliday junction complex reveals an unfolded junction. *Journal of Molecular Biology*, 252(2) :213–226, 1995. J. Mol. Biol.
- [186] A. Saito, H. Iwasaki, M. Ariyoshi, K. Morikawa, and H. Shinagawa. Identification of 4 acidic amino-acids that constitute the catalytic center of the ruvc holliday junction resolvase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16) :7470–7474, 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [187] R. J. Bennett and S. C. West. Ruvc protein resolves holliday junctions via cleavage of the continuous (noncrossover) strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12) :5635–5639, 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [188] F. E. Benson and S. C. West. Substrate-specificity of the escherichia-coli ruvc protein - resolution of 3-stranded and 4-stranded recombination intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, 269(7) :5195–5201, 1994. J. Biol. Chem.
- [189] D. Zerbib, C. Mezard, H. George, and S. C. West. Coordinated actions of ruvabc in holliday junction processing. *Journal of Molecular Biology*, 281(4) :621–630, 1998. J. Mol. Biol.
- [190] A. K. Eggleston and S. C. West. Cleavage of holliday junctions by the escherichia coli ruvabc complex. *Journal of Biological Chemistry*, 275(34) :26467–26476, 2000. J. Biol. Chem.
- [191] A. J. van Gool, R. Shah, C. Mezard, and S. C. West. Functional interactions between the holliday junction resolvase and the branch migration motor of escherichia coli. *Embo Journal*, 17(6) :1838–1845, 1998.
- [192] A. A. Davies and S. C. West. Formation of ruvabc-holliday junction complexes in vitro. *Current Biology*, 8(12) :725–727, 1998. Curr. Biol.
- [193] K. Yamada, M. Ariyoshi, and K. Morikawa. Three-dimesional structural views of branch migration and resolution in dna homologous recombination. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(2) :130–137, 2004. Curr. Opin. Struct. Biol.
- [194] Y. W. Han, H. Iwasaki, T. Miyata, K. Mayanagi, K. Yamada, K. Morikawa, and H. Shinagawa. A unique beta-hairpin protruding from aaa(+) atpase domain of ruvb motor protein is involved in the interaction with ruva dna recognition protein for branch migration of holliday junctions. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37) :35024–35028, 2001. J. Biol. Chem.
- [195] P. E. Marrione and M. M. Cox. Allosteric effects of ruva protein, atp, and dna on ruvb protein-mediated atp hydrolysis. *Biochemistry*, 35(34) :11228–11238, 1996.

- [196] P. E. Marrione and M. M. Cox. Ruvb protein-mediated atp hydrolysis - functional asymmetry in the ruvb hexamer. *Biochemistry*, 34(30) :9809–9818, 1995.
- [197] T. Hishida, H. Iwasaki, T. Yagi, and H. Shinagawa. Role of walker motif a of ruvb protein in promoting branch migration of holliday junctions - walker motif a mutations affect atp binding, atp hydrolyzing, and dna binding activities of ruvb. *Journal of Biological Chemistry*, 274(36) :25335–25342, 1999. J. Biol. Chem.
- [198] T. Hishida, H. Iwasaki, Y. W. Han, T. Ohnishi, and H. Shinagawa. Uncoupling of the atpase activity from the branch migration activity of ruvb protein complexes containing both wild-type and atpase-defective ruvb proteins. *Genes to Cells*, 8(9) :721–730, 2003. Genes Cells.
- [199] T. Hishida, Y. W. Han, S. Fujimoto, H. Iwasaki, and H. Shinagawa. Direct evidence that a conserved arginine in ruvb aaa(+) atpase acts as an allosteric effector for the atpase activity of the adjacent subunit in a hexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26) :9573–9577, 2004. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [200] C. Mezard, A. A. Davies, A. Stasiak, and S. C. West. Biochemical properties of ruvb(d113n) : A mutation in helicase motif ii of the ruvb hexamer affects dna binding and atpase activities. *Journal of Molecular Biology*, 271(5) :704–717, 1997. J. Mol. Biol.
- [201] H. George, C. Mezard, A. Stasiak, and S. C. West. Helicase-defective ruvb(d113e) promotes ruvb-mediated branch migration in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 293(3) :505–519, 1999. J. Mol. Biol.
- [202] C. Mezard, H. George, A. A. Davies, A. J. van Gool, D. Zerbib, A. Stasiak, and S. C. West. Escherichia coli ruvb(l268s) : a mutant ruvb protein that exhibits wild-type activities in vitro but confers a uv-sensitive ruv phenotype in vivo. *Nucleic Acids Research*, 27(5) :1275–1282, 1999. Nucleic Acids Res.
- [203] J. F. Allemand. *Micro-manipulation de molécules d'ADN isolées*. PhD thesis, Universités Paris 6 et Paris 7, 1997.
- [204] T. Strick. *Enroulement mécanique de l'ADN et relaxation par les Topoisomérases*. PhD thesis, Université Paris 6, 1999.
- [205] F. Reif. *Fundamentals of Statistical and Thermal Physics*. McGraw-Hill Series in Fundamentals of Physics. McGraw-Hill, hardcover edition, 1965.
- [206] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. Behavior of supercoiled dna. *Biophysical Journal*, 74(4) :2016–2028, 1998. Biophys. J.
- [207] A. J. Courey and J. C. Wang. Cruciform formation in a negatively supercoiled dna may be kinetically forbidden under physiological conditions. *Cell*, 33(3) :817–829, 1983. Cell.
- [208] T. R. Strick, V. Croquette, and D. Bensimon. Homologous pairing in stretched supercoiled dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18) :10579–10583, 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [209] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled dna molecule. *Science*, 271(5257) :1835–1837, 1996.
- [210] T. R. Strick, D. Bensimon, and V. Croquette. Micro-mechanical measurement of the torsional modulus of dna. *Genetica*, 106(1-2) :57–62, 1999. Genetica.

- [211] Z. Bryant, M. D. Stone, J. Gore, S. B. Smith, N. R. Cozzarelli, and C. Bustamante. Structural transitions and elasticity from torque measurements on dna. *Nature*, 424(6946) :338–341, 2003. *Nature*.
- [212] J. D. Moroz and P. Nelson. Entropic elasticity of twist-storing polymers. *Macromolecules*, 31(18) :6333–6347, 1998. *Macromolecules*.
- [213] C. Bouchiat and M. Mezard. Elasticity model of a supercoiled dna molecule. *Physical Review Letters*, 80(7) :1556–1559, 1998. *Phys. Rev. Lett.*
- [214] H.A. Kramers. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica*, 7(4) :284–304, 1940.
- [215] P. Hänggi, P. Talkner, and M. Borkovec. Reaction-rate theory : fifty years after kramers. *Review of Modern Physics*, 62(2) :251–341, 1990.
- [216] L. I. McCann, Dykman M., and B. Golding. Thermally activated transitions in a bistable three-dimensional optical trap. *Nature*, 402 :785–787, 1999.
- [217] K. J. Laidler and M. C. King. The development of transition-state theory. *Journal of Physical Chemistry*, 87(15) :2657–2664, 1983. *J. Phys. Chem.*
- [218] D. G. Truhlar, B. C. Garrett, and S. J. Klippenstein. Current status of transition-state theory. *Journal of Physical Chemistry*, 100(31) :12771–12800, 1996. *J. Phys. Chem.*
- [219] J. Ninio. Alternative to the steady-state method - derivation of reaction-rates from 1st-passage times and pathway probabilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(3) :663–667, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- [220] Howard C. Berg. *Random Walk in Biology*. Princeton University Press, expanded edition, 1993.
- [221] C. Bouchiat and M. Mezard. Elastic rod model of a supercoiled dna molecule. *European Physical Journal E*, 2(4) :377–402, 2000. *Eur. Phys. J. E.*
- [222] T. Strick, J. F. Allemand, V. Croquette, and D. Bensimon. Twisting and stretching single dna molecules. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 74(1-2) :115–140, 2000. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*
- [223] S. Cocco, J. F. Marko, and R. Monasson. Theoretical models for single-molecule dna and rna experiments : From elasticity to unzipping. *Comptes Rendus Physique*, 3(5) :569–584, 2002. *C. R. Phys.*
- [224] P. Nelson. Transport of torsional stress in dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(25) :14342–14347, 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Résumé

Ce travail présente tout d'abord l'étude, à l'échelle de la molécule individuelle, de l'intermédiaire de recombinaison formé par l'échange de simples brins entre deux molécules d'ADN homologues : la jonction de Holliday.

Nous montrons tout d'abord qu'il est possible, à partir d'un ADN portant une séquence entièrement palindromique, de former une jonction de Holliday en appliquant une torsion négative. Une fois la jonction formée, la torsion permet également de contrôler de façon directe l'échange des simples brins. Cette technique nous a permis d'accéder expérimentalement, avec une très bonne précision, à la valeur en solution du pas hélicoïdal de l'ADN : 3.61 ± 0.03 nm/tr.

Ensuite nous avons étudié, en présence d'ions magnésium, la cinétique de migration de la jonction de Holliday sous l'influence des contraintes mécaniques. Une modélisation simple du comportement de la jonction de Holliday vis-à-vis des contraintes mécaniques a été développée permettant d'expliquer leur influence sur le mécanisme de migration.

L'échange des simples brins peut également être catalysé par certaines enzymes. Le travail mécanique développé au cours de cette activité catalytique fait de ces enzymes des moteurs moléculaires. La seconde partie de ce travail porte sur l'étude en molécule unique d'un tel moteur : le complexe RuvAB de la bactérie *Escherichia coli*.

Nous avons tout d'abord caractérisé la migration de jonctions de Holliday individuelles sous l'action du complexe RuvAB. Nous avons notamment montré la très grande processivité du complexe et nous avons pu estimer la vitesse de migration à 37°C et en présence d'1 mM d'ATP : ~ 43 paires de bases échangées par seconde.

D'autre part, et pour finir, nous avons mis en évidence le rôle catalytique de la sous-unité RuvA dans l'échange des paires de bases au niveau du point de branchement.

Abstract

This work is a study, at the single molecule level, of the recombination intermediate produced when two homologous DNA molecules exchange their single-strands : the Holliday junction.

First, we show that a negative torque applied on a DNA molecule with an entirely palindromic sequence leads to the formation of a Holliday junction. The strand exchange can then be directly driven by mechanical torsion. Using this technique we accessed experimentally, and for the first time with such a precision, to the value in solution of the helical pitch of DNA : 3.61 ± 0.03 nm/tr.

We also studied the kinetics of the strand exchange process under the influence of mechanical constraints and in the presence of magnesium ions. We then developed a simple model of the mechanical behavior of the Holliday junction under mechanical constraint in order to interpret the experimental data.

The single-strand exchange can also be catalyzed by specific enzymes. The mechanical work produced during this activity defines these proteins as molecular motors. The second part of this work concerns the study, at the single molecule level, of one of these enzymes : the RuvAB complex of the bacteria *Escherichia coli*.

Firstly, we characterized the RuvAB migration activity on single Holliday junctions. In particular, we found that the complex is highly processive and we estimated its speed at 37°C and in presence of 1 mM ATP : ~ 43 base pairs exchanged per second.

Furthermore, we have shown that the RuvA subunit alone catalyzes the exchange of base-pairs that occurs at the branch point of the structure.